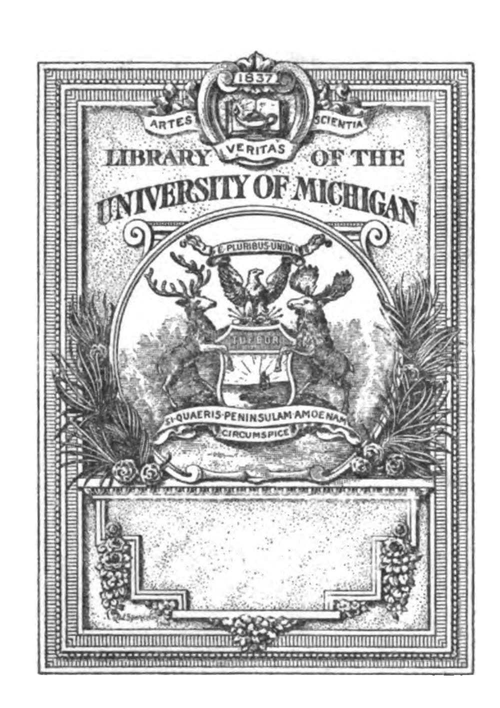
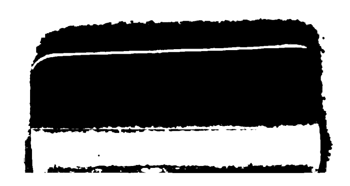

B 3 9015 00223 653 0
University of Michigan – BUHR




1837
ARTES
SCIENTIA
VERITAS
LIBRARY OF THE
UNIVERSITY OF MICHIGAN
E PLURIBUS UNUM
TUEBOR
SI QUAERIS PENINSULAM AMOENAM
CIRCUMSPICE



BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

DRITTER BAND

BEITRÄGE

ZUR

CHEMISCHEN PHYSIOLOGIE

UND

PATHOLOGIE

ZEITSCHRIFT FÜR DIE GESAMTE BIOCHEMIE

UNTER

MITWIRKUNG VON FACHGENOSSEN HERAUSGEGEBEN

VON

FRANZ HOFMEISTER

O. PROFESSOR DER PHYSIOLOGISCHEN CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STRASSBURG

DRITTER BAND

BRAUNSCHWEIG

DRUCK UND VERLAG VON FRIEDRICH VIEWEG UND SOHN

1903

INHALT.

A. Abhandlungen.

Seite

B. Kürzere Mitteilungen.

I.

Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Beziehungen der schwefelhaltigen Eiweifsabkömmlinge.

Erste Mitteilung.

Über die Konstitution des Cystins.

Von **E. Friedmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Das Cystin wurde 1810 von Wollaston*) in einem Blasenstein, der fast ganz aus Cystin bestand, entdeckt. Die erste Analyse rührt von Prout her, der den Schwefelgehalt dieses Körpers übersah. Derselbe wurde von Baudrimont und Malaguti**) entdeckt, ohne von ihnen bestimmt zu werden. Die erste vollständige Analyse findet sich bei Thaulow***), der auf Grund seiner Analysenzahlen für das Cystin, oder wie er es in Anlehnung an die englische Bezeichnung Cystic Oxyd nennt, für das Blasenoxyd die Formel $C_6N_2H_{12}O_4S_2$ aufstellte†). Diese Formel wurde von Gmelin willkürlich halbiert, und da die so erhaltene Formel eine unpaare Atomzahl $C_3H_6NSO_2$ hatte, verworfen und ebenso willkürlich durch die Formel $C_3H_7NSO_2$ ersetzt††).

Die so angeregte Frage nach der Anzahl der Wasserstoffatome und die damit aufs engste verbundene nach der Molekulargröfse des Cystins wurde der Ausgangspunkt für die weitere Erforschung dieses Körpers.

*) Philosophical Transact. 1810, S. 223.
**) Journal d. Pharm. 24, 663.
***) Liebigs Annalen 27, 197 und Journal d. Pharm. 24, 629.
†) Liebigs Annalen 27, 200.
††) Gmelin, Handbuch, IV. Aufl., 5, 133.

Neben den beiden von Thaulow einerseits und von Gmelin andererseits aufgestellten Cystinformeln stellten Dewar und Gamgee*) eine dritte Formel auf Grund eigener Analysen auf, sie entschieden sich für eine um 2 Wasserstoffatome ärmere Formel als Gmelin und schrieben $C_3H_5NSO_2$. Bemerkenswert ist ihr Versuch, einen ersten Einblick in die Konstitution des Cystins zu erlangen. Sie liefsen salpetrige Säure auf dasselbe einwirken und geben dabei an, Brenztraubensäure erhalten zu haben. Sie fassen deshalb das Cystin als β-Aminothiobrenztraubensäure auf: $CH_2(NH_2).CS.COOH$.

Diese Formel liefs erwarten, dafs man bei der Alkalispaltung aus dem Cystin Methylamin gewinnen könnte. Hoppe-Seyler**) führte diese Spaltung als erster aus, er erhielt aber kein Methylamin, sondern fand, dafs der Stickstoff als Ammoniak abgespalten wird. Er entschied sich auf Grund seiner Analysenzahlen für die Gmelinsche Formel $C_3H_7NSO_2$, obgleich seine Wasserstoffzahlen zu niedrig ausgefallen waren.

Külz***) versuchte die Frage nach der Anzahl der Wasserstoffatome im Cystin auf dem Wege der Analyse zu entscheiden. So bedenklich ein solcher Weg auch erscheint, so glaubte er sich doch auf Grund seiner, allerdings mit gröfster Sorgfalt ausgeführten, Analysen zu dem Schlusse berechtigt, dafs die Gmelinsche Formel zu verwerfen wäre, und an ihre Stelle die alte Formel von Thaulow zu treten hätte. Damit mufste auch ein Molekulargewicht für das Cystin angenommen werden, das die doppelte Gröfse von dem nach der Gmelinschen Formel gebauten Cystin hatte. Külz schrieb deshalb dem Cystin die Zusammensetzung $C_6H_{12}N_2S_2O_4$ zu. Ausschlaggebend war für ihn der Umstand, dafs seine Wasserzahlen stets zu niedrig im Vergleich mit den nach der Gmelinschen Formel berechneten Zahlen ausgefallen waren, wo doch erfahrungsgemäfs Wasserstoffbestimmungen eher zu hoch als zu niedrig ausfallen, hingegen gute Übereinstimmung mit den nach der Thaulowschen Formel sich ergebenden Werten zeigten.

Auf einem ganz anderen Wege gelangte Baumann†) zu demselben Resultat wie Külz. Baumann zeigte, dafs das Cystin bei der Reduktion mit Zinn und Salzsäure eine neue Base liefert, die sich deutlich als Reduktionsprodukt des Cystins erweist, und deren

*) Journal of Anat. and Physiol. 7, 142.
**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 5, 330.
***) Zeitschr. f. Biologie 20, 1.
†) Zeitschr. f. physiol. Chemie 8, 300.

Analyse Werte ergab, welche der dem Cystin von Gmelin zugeschriebenen Formel $C_3H_7NSO_2$ entsprachen. Er nannte dieses Reduktionsprodukt des Cystins Cystein und machte auf Grund der Analyse und des chemischen Verhaltens mit Recht darauf aufmerksam, dafs sich dasselbe zum Cystin durchaus verhält wie ein Merkaptan zu seinem Disulfid:

$$2(C_3H_6NO_2.SH) + O = \begin{array}{l} C_3H_6NO_2\text{—}S \\ \qquad\qquad\;\; | \\ C_3H_6NO_2\text{—}S \end{array} + H_2O.$$

Für Baumann bildete der Nachweis, dafs das Cystin ein Disulfid ist, den Endpunkt einer eigenartigen Beweisführung der Konstitution des Cystins, deren einzelne Elemente zum gröfsten Teil in Analogieen bestanden, die sich ihm beim Studium der Merkaptursäuren ergeben hatten. Diese interessanten Körper sind Stoffwechselprodukte, die Baumann in Gemeinschaft mit Preufse*) und gleichzeitig mit Jaffé**) im Harn von Hunden entdeckte, die mit Halogenbenzolen gefüttert waren. Baumann und Preufse (l. c.) fanden, dafs nach Brombenzolfütterung im Hundeharn eine Substanz auftritt, die durch aufserordentliches Vermögen, die Ebene des polarisierten Lichtes nach links abzulenken, ausgezeichnet ist. Diese linksdrehende Substanz ist sehr zersetzlich; bei Einwirkung verdünnter Säuren und Alkalien, auch schon bei längerem Erhitzen auf dem Wasserbade, nimmt die Linksdrehung allmählich ab und verschwindet zuletzt. Bei dieser Zersetzung wird eine sehr gut charakterisierte Säure gebildet, welche Brom, Stickstoff und Schwefel enthält, und die sie Bromphenylmerkaptursäure nannten. Aus den Analysen berechnete sich für letztere die Formel $C_{11}H_{12}BrNSO_3$. Der Konstitutionsnachweis der Bromphenylmerkaptursäure beruht auf folgenden von Baumann und Preufse ermittelten Thatsachen.

Durch längeres Kochen mit konzentrierter Salzsäure oder besser durch halb- bis dreiviertelstündiges Kochen mit verdünnter Schwefelsäure wird die Bromphenylmerkaptursäure in Essigsäure und eine neue, Brom, Stickstoff und Schwefel enthaltende Verbindung gespalten. Diesem Körper kommt die Zusammensetzung $C_9H_{10}BrNSO_2$ zu. Auch Jaffé hat ihn in den Händen gehabt, und die von ihm mitgeteilten Analysenzahlen zeigen gute Übereinstimmung mit den von Baumann und Preufse erhaltenen

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 5, 328.

**) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 12, 1092.

Werten. Die Zersetzung durch Säuren findet in folgender Weise statt:

$$C_{11}H_{12}BrSNO_3 + H_2O = CH_3.COOH + C_9H_{10}BrNSO_2.$$

Eine Betrachtung dieser letzten Formel liefs die Vermutung entstehen, dafs in dem Körper $C_9H_{10}BrNSO_2$ der einwertige Rest (C_6H_4Br) ein Wasserstoffatom eines Körpers ersetzt, dessen Zusammensetzung $C_3H_7NSO_2$ sein müfste. Diese Formel aber entspricht der alten Cystinformel Gmelins, und die weiteren Zersetzungen dieses Körpers schienen Baumann und Preufse dafür zu sprechen, „dafs er in der That ein Derivat des Cystins ist, in welchem der aromatische Atomkomplex durch den Schwefel mit dem Reste des Cystins verbunden ist". Sie bezeichneten ihn daher als Bromphenylcystin, eine Benennung, die Baumann später konsequent in Bromphenylcystein abänderte. Bei der Zersetzung dieses Körpers mit verdünnter Natronlauge konnte leicht gezeigt werden, dafs nahezu der gesamte Stickstoff als Ammoniak abgespalten wird, während der Schwefel als Parabromphenylmerkaptan in annähernd theoretischen Mengen austritt. Daneben wird ein dritter Körper gebildet, dessen Erkennung zu Anfang mit Schwierigkeiten verbunden war, der jedoch bald als Brenztraubensäure erkannt wurde.

Der Nachweis, dafs dieser dritte Körper wirklich Brenztraubensäure ist, bildet den Kernpunkt der Baumannschen Beweisführung über die Konstitution der Merkaptursäuren. Es sei deshalb gestattet, ausführlicher auf die einzelnen Argumente einzugehen.

Baumann und Preufse konnten zeigen, dafs nach kurzer Einwirkung von Natronlauge auf Bromphenylcystein eine ätherlösliche Säure gebildet wird, deren wässerige Lösung mit Eisenvitriollösung eine von Debus*) als charakteristisch für Brenztraubensäure beschriebene Rotfärbung zeigte, und die in alkalischer Lösung Kupferoxyd beim Erwärmen reduzierte. Versuche, ein Calcium- oder Baryumsalz dieser Säure darzustellen, scheiterten, da die wässerigen Lösungen dieser Salze sich unter Abscheidung amorpher, in heifsem Wasser unlöslicher Niederschläge zersetzten.

Beim andauernden Kochen der ätherlöslichen Säure mit überschüssigem Calcium- oder Barythydrat wurde reichlich Oxalsäure gebildet. Dieselbe ist auch nach längerer Einwirkung von Natronlauge auf das Bromphenylcystein selber nachzuweisen, während sie bei kurzer Einwirkung in nur geringer, leicht zu übersehender

*) Ann. d. Pharm. **106**, 84.

Menge gebildet wird. Von Wichtigkeit ist, dafs sie als Spaltungsprodukt der ätherlöslichen Säure nachgewiesen ist.

Neben Oxalsäure wird nach zehnstündigem Kochen von Bromphenylcystein mit Barytwasser noch eine andere im Wasser unlösliche, in Alkohol und Äther lösliche Säure gebildet. Dieselbe wurde als Uvitinsäure erkannt. Sie krystallisiert in kleinen mikroskopischen Nadeln, die zwischen 288° und 289° schmelzen und bei weiterem Erhitzen unzersetzt flüchtig sind. Die Analyse ergab die Zusammensetzung $C_9H_8O_4$, die durch die Analyse des Baryumsalzes bestätigt wurde. Jedoch lieferten 45 g Bromphenylcystein nur 0,3 g Uvitinsäure nach zehnstündigem Kochen mit überschüssigem Barytwasser. Der Nachweis, dafs sie in einer Beziehung zu der ätherlöslichen Säure steht, ist nicht geführt worden.

In der Bildung von Oxalsäure und Uvitinsäure bei der Alkalispaltung des Bromphenylcysteins sehen Baumann und Preufse den ersten Grund, um die beobachtete ätherlösliche Säure als Brenztraubensäure anzusprechen, ja, die oben mitgeteilten Thatsachen genügen ihnen, um bereits jetzt zu dem Schlusse zu kommen, dafs die vorliegende Substanz Brenztraubensäure ist*).

Es ist aber bei vorurteilsloser Betrachtung klar, dafs es wohl so sein kann, aber nicht so sein mufs. Nach zehnstündiger Alkalispaltung ist aus dem Auftreten von Oxalsäure unter den Spaltungsprodukten überhaupt kein sicherer Schlufs auf die Muttersubstanz derselben möglich, da die Oxalsäure als Endprodukt von Alkalispaltungen häufig beobachtet worden ist. Ferner ist es nicht thunlich, bei einer Ausbeute von 0,3 g Uvitinsäure aus 45 g Bromphenylcystein dem Auftreten derselben eine Beweiskraft für die Konstitution des gespaltenen Körpers zuzusprechen, abgesehen davon, dafs ihre Bildung nach zehnstündiger Alkalieinwirkung ein viel zu unübersichtlicher Vorgang ist, um ihr Auftreten als Konstitutionsbeweis verwerten zu können. Auch die Kombination beider Thatsachen als Argument für die Natur des Zwischengliedes ist nicht statthaft, da dann erst die Berechtigung zu einer solchen genetischen Verknüpfung zu zeigen wäre.

Die reichliche Bildung von Oxalsäure und die spärliche Bildung von Uvitinsäure bei der Alkalispaltung scheinen mir deshalb allein nicht genügend, um die ätherlösliche Säure als Brenztraubensäure anzusprechen. Der Nachweis von Oxalsäure und Uvitinsäure gewinnt aber durch eine Reihe anderer Thatsachen an

*) l. c., S. 324.



Bedeutung, die einwandsfrei die fragliche als Zwischenprodukt auftretende Säure als Brenztraubensäure charakterisieren. Baumann und Preufse konnten nämlich weiter zeigen, dafs der bei Übersättigen der ätherlöslichen Säure mit Barytwasser gebildete Niederschlag bei der Baryumbestimmung Werte ergab, die nur wenig höher waren, als hydruvinsaurer Baryt verlangt. Nun hatten Fittig und Böttinger*) in der That gezeigt, dafs bei dieser Behandlung Brenztraubensäure ein Baryumsalz der Hydruvinsäure liefert.

Ferner war seit den Untersuchungen von Wislicenus**) und Debus***) bekannt, dafs Brenztraubensäure durch nascierenden Wasserstoff leicht in Gärungsmilchsäure übergeht. Baumann und Preufse versuchten deshalb, einmal direkt aus der bei der Alkalispaltung von Bromphenylcystein erhaltenen und für Brenztraubensäure angesprochenen Säure durch Reduktion mit Natriumamalgam in der Kälte Milchsäure zu gewinnen, und erhielten in der That eine ätherlösliche Säure, die ein gut krystallisiertes Zinksalz lieferte. Aber die erhaltene Menge des Zinksalzes reichte für eine weitere Untersuchung nicht aus. Auf der anderen Seite gingen sie unter Verzicht auf eine Isolierung der ätherlöslichen Säure vom Bromphenylcystein selber aus. Sie erhielten jetzt leicht die gesuchte Säure in genügender Menge, um zeigen zu können, dafs deren Calcium- und Zinksalz die Zusammensetzung des gärungsmilchsauren Calciums resp. Zinks hatte.

Ein völlig einwandsfreier Nachweis der Brenztraubensäure glückte aber erst, als das von E. Fischer und Jourdan†) beschriebene, charakteristische Phenylhydrazinderivat der Brenztraubensäure zum Nachweis derselben herangezogen wurde. Die ersten Angaben über den so erhaltenen Körper finden sich in einer Arbeit von König††), „Über die Oxydationsprodukte der Merkaptursäuren“, die im Baumannschen Laboratorium ausgeführt worden ist. König konnte die Merkaptursäuren mit Permanganat in der Kälte bei Anwesenheit geringer Mengen freien Alkalis in Sulfone überführen, die durch Alkali leicht verseift werden konnten. Die bei dieser Zersetzung nach kurzer Zeit auftretende Brenztraubensäure wurde als Phenylhydrazonbrenztraubensäure isoliert.

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 5, 956.
**) Ann. d. Pharm. 126, 225.
***) Ann. d. Pharm. 127, 332.
†) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 16, 2241.
††) Zeitschr. f. physiol. Chemie 16, 547 (1892).

„Ihr Schmelzpunkt lag in Übereinstimmung mit der von **Fischer** aus reiner Brenztraubensäure dargestellten Verbindung bei 192 bis 193°." Auch die Analyse bestätigte, dafs es sich um Phenylhydrazonbrenztraubensäure handelte.

In derselben Weise konnten **Baumann** und **Schmitz***) nach kurzer Einwirkung von 10 proz. Natronlauge auf Jodphenylmerkaptursäure die Bildung von Brenztraubensäure durch Darstellung der bei 192° schmelzenden Phenylhydrazonbrenztraubensäure sicher stellen.

Durch den einwandsfreien Nachweis der Brenztraubensäure unter den Spaltungsprodukten der Merkaptursäuren ist die Konstitution derselben klar gestellt, und die gefundenen Thatsachen finden ihren einfachsten Ausdruck in der Formel

$$CH_3CO.NH.\underset{\displaystyle COOH}{\overset{\displaystyle CH_3}{C}}.S.C_6H_4X.$$

Schon in seiner ersten mit **Preufse** gemeinschaftlich ausgeführten Untersuchung über die Merkaptursäuren versuchte **Baumann** die hier gewonnenen Erfahrungen auf das Cystin zu übertragen und gab der Meinung Ausdruck, dafs dem Cystein die Konstitutionsformel

$$NH_2.\underset{\displaystyle COOH}{\overset{\displaystyle CH_3}{C}}.SH$$

zugeschrieben werden müfste, wenn es gelänge, zu zeigen, dafs bei der Alkalispaltung des Cystins Schwefelwasserstoff, Ammoniak und Brenztraubensäure gebildet würde. Dementsprechend konzentriert sich der **Baumann**sche Konstitutionsbeweis des Cystins ebenfalls auf den Nachweis der Brenztraubensäure unter den Spaltungsprodukten des Cystins, da das Auftreten von Ammoniak und Schwefelwasserstoff bei der Alkalispaltung bereits längst bekannte Thatsachen waren.

Ueber das Auftreten von Brenztraubensäure beim Abbau des Cystins liegt, wie erwähnt, eine Angabe von **Dewar** und **Gamgee** vor**). Diese Forscher glaubten bei der Einwirkung von salpetriger Säure auf Cystin Brenztraubensäure erhalten zu haben. Sie erhielten nämlich eine ätherlösliche Säure, deren amorphes, in Wasser un-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 592 (1895).

**) Journal of Anat. and Physiol. 5, 142.



lösliches Silbersalz dargestellt und analysiert wurde, und schliefsen „aus der nahen Übereinstimmung der Zusammensetzung dieses Salzes mit brenztraubensaurem Silber", Brenztraubensäure in den Händen gehabt zu haben. Die Analysen der Silbersalze der fraglichen Säure, die aus zwei verschiedenen Darstellungen gewonnen waren, zeigen aber weder unter sich noch mit den für brenztraubensaures Silber berechneten Werten eine genügende Übereinstimmung, um zu diesem Schlusse zu berechtigen.

	I	II	ber. f. $C_3H_3O_3Ag$.
C	19,34 Proz.	21,32 Proz.	18,46 Proz.
H	5,29 „	4,64 „	1,53 „
Ag	56,9 „	57,5 „	55,38 „

Die Verfasser glauben zwar aus dem Vergleich der Reaktionen der aus Cystin erhaltenen Substanz mit denen der Brenztraubensäure mit Sicherheit behaupten zu können, dafs die beiden Körper identisch seien, da jedoch die betreffenden Reaktionen nicht weiter angegeben werden, worauf auch Baumann und Preufse aufmerksam machen, so ist die Bedeutung dieser Behauptung schwer zu beurteilen.

Übrigens zeigt ein direkter von Brenzinger*) bei Baumann mit Brenztraubensäure ausgeführter Versuch, dafs bei Behandlung einer wässerigen Lösung derselben mit salpetrigsaurem Natrium schon nach 5 Minuten die Brenztraubensäure selbst mit der so empfindlichen Phenylhydrazinprobe nicht mehr nachzuweisen ist. Er folgert deshalb mit Recht, dafs es im Gegensatz zu den Angaben von Dewar und Gamgee nicht möglich ist, aus dem Cystin durch Einwirkung von salpetriger Säure Brenztraubensäure in Substanz zu erhalten. Auch konnte er dementsprechend zeigen, dafs nach Einwirkung von salpetriger Säure auf Äthylcystein in der Reaktionsflüssigkeit keine Spur von Brenztraubensäure nachweisbar ist.

Es sei gleich hervorgehoben, dafs sämtliche Versuche, Brenztraubensäure als solche unter den durch Alkali erhaltenen Spaltungsprodukten des Cystins oder seiner Derivate zu isolieren, von gänzlich negativem Resultate begleitet waren. Und doch berechtigte gerade das erwähnte Äthylcystein am meisten zu der Hoffnung, hier denselben Spaltungsprodukten zu begegnen wie bei der Zersetzung des Phenylcysteins, da es sich nach seiner Darstellung**) aus dem

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 16, 569 (1892).
**) l. c., S. 562.

Quecksilbermerkaptid des Cysteins, unter Zugrundelegung der Baumannschen Cystinformel, vom Phenylcystein nur durch den Ersatz der Phenylgruppe durch die Äthylgruppe unterscheidet.

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ NH_2 . C . SC_2H_5, \\ | \\ COOH \end{array} \qquad \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ NH_2 . C . SC_6H_5. \\ | \\ COOH \end{array}$$

Äthylcystein Phenylcystein

Bei der Spaltung des Athylcysteins mit fixen Alkalien wurde zwar analog der gleichen Zersetzung des Phenylcysteins Merkaptan und Ammoniak abgespalten, aber einzig in der Thatsache, dafs diese beiden Atomgruppen abgespalten werden, besteht eine Analogie zu dem Verhalten des Phenylcysteins, die Art der Abspaltung ist bei beiden Körpern verschieden. Auf diesen Punkt soll später ausführlich eingegangen werden, hier sei nur erwähnt, dafs die Zersetzung des Äthylcysteins durch Alkali überhaupt viel langsamer verläuft als die des Phenylcysteins und der Merkaptursäuren, und Baumann und seine Mitarbeiter sehen hierin den Grund, weshalb es ihnen in dem einen Falle mit Leichtigkeit gelingt, Brenztraubensäure nachzuweisen, in dem anderen Falle aber überhaupt nicht. Denn Brenzinger*) konnte zeigen, dafs zwar nach 5 Minuten langem Erhitzen der Brenztraubensäure mit 10 Proz. Natronlauge in der angesäuerten Flüssigkeit Brenztraubensäure noch reichlich nachgewiesen werden konnte, dafs aber nach 20 Minuten langem Erhitzen kein Brenztraubensäurehydrazen mehr zu erhalten ist. Bei Versuchen, Äthylcystein mit Sodalösung anstatt mit freiem Alkali zu erhitzen, stellte es sich heraus, dafs hierzu eine Zeit erforderlich ist, die genügte, um, wie Kontrollversuche zeigten, die etwa gebildete Brenztraubensäure wieder zu zerstören. „Erhitzen des Äthylcysteins mit freiem Phenylhydrazin führte zu keinem besseren Resultate, ebenso wenig als durch Erhitzen von Äthylcystein mit essigsaurem Phenylhydrazin auf 130° Phenylhydrazonbrenztraubensäure abgeschieden werden konnte.“ Ob hier Zersetzung des Äthylcysteins stattgefunden hat und dementsprechend die Möglichkeit zur Bildung von Phenylhydrazonbrenztraubensäure gegeben war oder nicht, scheint nicht untersucht worden zu sein.

Einen Grund für das ungleiche Verhalten des Äthylcysteins und des Phenylcysteins glaubt Brenzinger in der „festeren Bindung“ des Thioäthylrestes gegenüber dem Thiophenylrest zu sehen. Abgesehen davon, dafs ein solcher Erklärungsversuch blofs eine

*) l. c., S. 567.

Umschreibung der Thatsachen ist, so ist er in diesem Falle um so mehr zurückzuweisen, als er den zu beweisenden analogen Bau des Äthylcysteins und des Phenylcysteins als Voraussetzung der obigen Erklärung einschliefst.

So bleibt als einzige Thatsache, die für eine gleiche Struktur des Merkaptursäurekernes und des Cysteins verwertet werden könnte, ein von Baumann ausgeführter Spaltungsversuch des Cystins übrig*). Baumann erhitzte 2 g Cystin mit etwa 75 ccm heifs gesättigtem Barytwasser 20 Stunden fortgesetzt am Rückflufskühler und konnte zeigen, dafs hierbei aufser Ammoniak und Kohlensäure Oxalsäure und Uvitinsäure gebildet wird. Er erhielt aus 2 g Cystin 0,416 g oxalsauren Kalk und etwa ein Centigramm einer Säure, die den Schmelzpunkt 286—287° der Uvitinsäure und die für diese angegebenen Löslichkeitsverhältnisse hatte. Baumann meint, dafs „mit dem Nachweis der Oxalsäure und der Uvitinsäure unter den Zersetzungsprodukten des Cystins die Übereinstimmung im Verhalten des Cystins und des Phenylcysteins in allen wesentlichen Punkten nachgewiesen ist", und es ist in der That nicht zu verkennen, dafs in diesem Punkte eine Analogie zwischen den beiden Substanzen vorliegt.

Für Baumann reihten sich nun diese Thatsachen zu folgender Kette zusammen:

> Oxalsäure und Uvitinsäure entstehen bei fortgesetzter Alkalispaltung der Merkaptursäuren,
>
> Oxalsäure und Uvitinsäure entstehen bei fortgesetzter Alkalispaltung des Cystins,
>
> Oxalsäure und Uvitinsäure entstehen nach den vorliegenden Beobachtungen gleichzeitig nur bei der Zersetzung der Brenztraubensäure,

und so zieht er scheinbar in ganz logischer Weise den Schlufs:

> Also entsteht die bei der Alkalispaltung des Cystins gebildete Oxalsäure und Uvitinsäure aus primär gebildeter Brenztraubensäure.

Und doch entbehrt diese Deduktion der zwingenden Beweiskraft. Es ist von vornherein klar, dafs mit dem Augenblick, wo man das gleichzeitige Auftreten von Oxalsäure und Uvitinsäure bei der Zersetzung einer anderen Substanz als Brenztraubensäure beobachtete, die ganze Beweisführung in ihrer logischen Verkettung hinfällig würde. Aber auch von diesem Falle abgesehen, zeigt eine

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 15 (1734).

genauere Prüfung der einzelnen Argumente, dafs es sich um eine lose, äufsere Aneinanderreihung ungleichwertiger Beweisstücke handelt, deren psychologische Verknüpfung wohl begreiflich, aber deren innerer, sachlicher Zusammenhang erst durch das Experiment zu bestätigen ist. Denn in dem ersten Falle (der Merkaptursäuren) ist Brenztraubensäure sicher als primäres Spaltungsprodukt nachgewiesen worden, und es ist bereits auseinandergesetzt worden, dafs nur deshalb dem Auftreten der Oxalsäure und Uvitinsäure erst Bedeutung beizulegen ist. In dem zweiten Fall (dem des Cystins) sind aber sämtliche Bemühungen, die Brenztraubensäure in Substanz zu isolieren, gescheitert, und deshalb ist es zwar möglich, dafs die gebildete Oxalsäure und Uvitinsäure aus intermediär gebildeter Brenztraubensäure stammen, aber nicht bewiesen.

Nach alledem ist es klar, dafs die vorliegenden chemischen Daten nicht genügen, um die von Baumann für das Cystein und Cystin aufgestellten Formeln

$$NH_2.\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{C}}.SH \quad \text{und} \quad NH_2.\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{C}}.S-S.\overset{\displaystyle CH_3}{\underset{\displaystyle COOH}{C}}.NH_2$$

als sicher begründet zu betrachten.

Wenn Baumann dennoch zähe an der obigen Anschauung über die Konstitution des Cystins festhält, trotz der sich mehrenden Beobachtungen, dafs die Alkalispaltung in ihren feineren Details beim Cystin anders verläuft als bei den Merkaptursäuren, so ist hierfür leicht eine Erklärung zu finden, die zwar nirgends als Begründung der Cystinformel herangezogen wird, die aber sicherlich einen wesentlichen Einflufs auf das Festhalten an obiger Formel trotz des dürftigen chemischen Untergrundes ausgeübt hat. Handelt es sich doch bei dem Cystin um einen Körper, der unzweifelhaft im intermediären Stoffwechsel von hervorragender Bedeutung ist. Sein Auftreten unter abnormen Verhältnissen im menschlichen Harn bei der sogenannten Cystinurie zeigt, dafs ein grofser Teil des mit dem Eiweifs eingeführten Schwefels als Cystin zur Ausscheidung gelangen kann. Und das Verhalten der Eiweifskörper selber gegen alkalische Bleilösungen, wo ein Teil des Schwefels als Bleisulfid abgespalten wird, ist schon sehr früh als cystinähnlich*) bezeichnet worden. Aufserdem lenkte die mehrfache gelegentliche Auffindung des Cystins im Tierkörper, so die von Cloëtta in Rindsnieren**),

*) Fleitmann, Ann. 66, 380 (1848).

**) Ann. 99, 289 (1856).

von Scherer*) in der Leber eines an Typhus gestorbenen Menschen und von Drechsel in der Pferdeleber**) und Delphinleber***) immer wieder die Aufmerksamkeit auf das Cystin und machte es wahrscheinlich, „dafs das Cystin ein intermediäres Spaltungsprodukt der Eiweifskörper ist“†). So lag denn für Baumann die Vermutung sehr nahe, dafs das Cystin und die Merkaptursäuren in engster genetischer Verknüpfung ständen, oder anders ausgedrückt, dafs die Merkaptursäurebildung im tierischen Organismus „eine experimentelle Cystinurie sei“††). Dann aber mufste auch das Cystin resp. das Cystein die gleiche Konstitution haben wie die stickstoff- und schwefelhaltige Komponente der Merkaptursäuren.

Dieses durch Einfachheit und Einheitlichkeit der Anschauung verführerische Bild gewann für Baumann erhöhte Wahrscheinlichkeit, als sein Schüler Suter unter den Spaltungsprodukten der Hornsubstanz α-Thiomilchsäure entdeckte†††). Da Suter die α-Thiomilchsäure nur einmal aus einer gefaulten und von Schimmelpilzen durchsetzten Tyrosinmutterlauge darstellen konnte, nehmen Baumann und Suter an, dafs die Thiomilchsäure nicht als primäres Spaltungsprodukt der Hornsubstanz, sondern als Fäulnisprodukt des Cysteins aufzufassen sei, und sehen hierin einen neuen Beweis für die Richtigkeit der Baumannschen Cystinformel.

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ NH_2.C.SH \\ | \\ COOH \end{array} + HH = \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ HC.SH \\ | \\ COOH \end{array} + NH_3$$

Es ist nicht zu verkennen, dafs einer der Hauptgründe, immer wieder auf dem Umwege der Analogie an das Cystin heranzutreten, in der Schwierigkeit zu suchen ist, sich genügende Mengen Cystin zur direkten chemischen Untersuchung zu verschaffen, da man ausschliefslich auf die äufserst seltenen Fälle von Cystinurie angewiesen war. Baumann hat zwar durch Suter untersuchen lassen, ob das Cystin als direktes Spaltungsprodukt der Keratinsubstanzen auftritt§), aber da diese Experimente ein negatives Resultat hatten, kam er zu der Anschauung, dafs nicht das Cystin selbst im Eiweifs

---

*) Jahresber. über d. Fortschr. d. Chemie 1857, S. 561.
**) Du Bois Reymonds Archiv S. 243 (1891).
***) Zeitschr. f. Biologie 33, 86.
†) Suter, Zeitschr. für physiol. Chemie 20, 565 (1895).
††) Baumann u. Preufse, l. c., S. 806.
†††) Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 577 (1895).
§) Das. 20, 564 und 583 (1895).

präformiert ist, sondern er stellte sich vor*), dafs etwa eine geschwefelte Asparaginsäure die Stammsubstanz des Cystins, der Merkaptursäuren und der Thiomilchsäure wäre.

$$\begin{array}{l} \quad\;\; CH_2.COOH \\ \qquad | \\ NH_2.C.SH \\ \qquad | \\ \quad\;\; COOH \end{array}$$

Aber schon ältere, mehr zufällige Befunde deuteten mit ziemlicher Sicherheit darauf hin, dafs das Cystin ein Spaltungsprodukt der Eiweifskörper ist. Külz**) gelang es, unter den pankreatischen Verdauungsprodukten des Fibrins Cystin zu isolieren, und Emmerling***) konnte einmal Cystin als direktes Spaltungsprodukt der Hornsubstanz erhalten. Aber beide Befunde sind als mehr oder weniger zufällige anzusehen. Erst Mörner†) gelang es, die regelmäfsige Bildung und das reichliche Auftreten von Cystin unter den bei der Hydrolyse des Keratins erhaltenen Spaltungsprodukten nachzuweisen, ein Befund, auf den kurz darauf und ohne Kenntnis der Mörnerschen Untersuchung auch G. Embden††) in Hofmeisters Laboratorium stiefs.

Nachdem so die Materialfrage gelöst war, konnten Baumanns im wesentlichen auf Deduktionen und Analogieen beruhende Anschauungen über die Konstitution des Cystins am Cystin direkt an der Hand des Experimentes geprüft werden, eine Aufgabe, die, wegen der grofsen physiologischen Bedeutung, die dieser Körper besitzt, besonders ansprechend erschien. Diese Untersuchung übergab mir Herr Professor Hofmeister im Mai 1900.

Bevor ich zur Beschreibung des von mir eingehaltenen Ganges der Untersuchung übergehe, seien in Kürze die chemischen Daten zusammengestellt, die vor Beginn meiner Arbeit am Cystin direkt gewonnen waren.

Der Schwefel des Cystins gilt für durch Alkalien leicht als Sulfid abspaltbar; jedoch geht aus den vorliegenden Untersuchungen hervor, dafs ein Teil des Schwefels durch diese Einwirkung nicht abgespalten werden kann. Baumann†††) hat gezeigt, dafs der Schwefel im Cystin disulfidartig gebunden ist, durch

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 585 (1895).
**) Zeitschr. f. Biologie 27.
***) Ref. in d. Chemiker-Zeitung Nr. 80, Okt. 1894.
†) Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 595 (1899).
††) Das. 32, 94 (1901).
†††) Das. 8, 300.

Reduktion konnte er das dem Cystin entsprechende Merkaptan, das Cystein, erhalten, das seinem chemischen Charakter entsprechende Farbenreaktionen mit Eisenchlorid und Kupfersulfat giebt. In dem Äthylcystein, das aus dem leicht zu gewinnenden, aber unregelmäfsig zusammengesetzten Quecksilbermerkaptid*) durch Umsatz mit Jodäthyl dargestellt wird**), ersetzt der Äthylrest das Wasserstoffatom der Thiogruppe, da das Äthylcystein bei der Alkalispaltung Äthylmerkaptan liefert. Auch gegen den Benzylrest ist dasselbe Wasserstoffatom leicht austauschbar und liefert ähnlich der Thiomilchsäure ein leicht fafsbares, gut charakterisiertes Benzylderivat***). Bei der Einwirkung von Alkalien liefert letzteres Benzylmerkaptan, so dafs auch hier der Eintrittsort des Substituenten aufser Zweifel steht.

Der Stickstoff des Cystins ist durch Alkali leicht als Ammoniak abspaltbar. Der Nachweis, dafs er als Amidogruppe im Cystin gebunden ist, wurde durch Darstellung der schwer löslichen Benzoylverbindung†) erbracht. Auch eine Uraminosäure††) oder vielmehr deren Anhydrid konnte leicht gewonnen werden.

Die Benzoylverbindung des Cystins verhält sich in ihren Salzen als zweibasische Säure, so dafs die Anwesenheit von zwei Karboxylgruppen im Cystin anzunehmen ist, eine Thatsache, die auch den leichten Übergang der Uraminosäure des Cystins in ihr Hydantion erklärt.

Für das Cystein (und daher auch für das Cystin) kommen auf Grund dieser Thatsachen folgende Formeln in Betracht, wovon Formel 1 der Baumannschen Auffassung des Cysteins entspricht.

$$\begin{array}{ll}
\text{1.} & \text{2.} \\
CH_3 & CH_2.NH_2 \\
| & | \\
C\begin{smallmatrix} NH_2 \\ SH \end{smallmatrix} & CH.SH \\
| & | \\
COOH & COOH \\
\\
\text{3.} & \text{4.} \\
CH\begin{smallmatrix} NH_2 \\ SH \end{smallmatrix} & CH_2.SH \\
| & | \\
CH_2 & CH.NH_2 \\
| & | \\
COOH & COOH
\end{array}$$

---

*) Brenzinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie 16, 557 (1892).

**) Brenzinger, Zeitschr. f. physiol. Chemie, l. c., S. 562.

***) Suter, Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 562 (1895).

†) Brenzinger, l. c., S. 572.

††) Brenzinger, l. c., S. 172.

Eigene Versuche.

1. Darstellung des Ausgangsmaterials.

Das zur Verarbeitung kommende Cystin wurde zu Beginn der Untersuchung aus Hornspänen dargestellt. Ich lehnte mich dabei ziemlich eng an das von G. Embden*) ausgearbeitete Verfahren der Cystindarstellung an, nur zog ich es vor, anstatt, wie Embden es gethan hat, Cystin und Tyrosin mit Hülfe verdünnter Salpetersäure zu trennen, diese beiden Körper aus ammoniakalischer Lösung mit Hülfe von Eisessig zu fraktionieren. Im einzelnen wurde wie folgt verfahren:

500 g Hornspäne werden mit 1500 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19) 4 Stunden in einem 5-Liter-Kolben auf dem Sandbade gekocht und nach dem Erkalten mit konz. Natronlauge bis zur schwach sauren Reaktion versetzt. (Die Natronlauge enthielt auf 750 ccm Wasser 500 g Ätznatron.) Die auf Zusatz der Natronlauge in lebhaftes Sieden geratene Flüssigkeit wird bei schwach saurer Reaktion mit Tierkohle, die reichlich und wiederholt eingetragen wird, etwa dreiviertel Stunden gekocht und heifs filtriert. Das hellgelbe, höchstens zweieinhalb Liter fassende Filtrat setzt beim Erkalten einen starken, krystallinischen Niederschlag ab, der aus Cystin, Tyrosin und Leucin besteht. Nach zwölfstündigem Stehen wird derselbe abgesaugt und mit wenig Wasser nachgewaschen. Die aus vier Zersetzungen erhaltenen Rohprodukte werden vereinigt und zusammen verarbeitet.

Zur Trennung des Cystins vom Tyrosin und anderen Aminosäuren werden die aus vier Zersetzungen gewonnenen Rohprodukte in 1 Liter heifsem, 10 proz. Ammoniak gelöst, die Lösung mit Eis gut gekühlt und vom ausgeschiedenen Tyrosin durch Filtration befreit. Zu dem Filtrat wird vorsichtig Eisessig zugesetzt, jedoch mufs die Reaktion deutlich alkalisch bleiben. Der sofort entstehende Niederschlag erweist sich unter dem Mikroskop betrachtet als aus charakteristischen Tyrosinnadeln bestehend. Derselbe wird abgesaugt und das Filtrat von neuem mit Eisessig versetzt. Für gewöhnlich bleibt die Flüssigkeit jetzt klar, bis die Reaktion stark essigsauer geworden ist, um dann einen schweren, sandigen Niederschlag von Cystin abzusetzen. In einem Falle jedoch begann die Cystinausscheidung bereits bei schwach ammoniakalischer Reaktion, aber auch hier war die Tyrosinausscheidung längst beendet, als die Cystinkrystallisation begann. Nach 24 stündigem Stehen wird das erhaltene Cystin abgesaugt, mit Wasser ausgewaschen, darauf mit Alkohol nachgewaschen, bis die Waschflüssigkeit farblos abläuft, und schliefslich mit wenig Äther der anhängende Alkohol entfernt.

Das so hergestellte Präparat besteht ausschliefslich aus rosettenförmig übereinander gelagerten, sechsseitigen Cystintafeln und ist in der Regel tyrosinfrei. (Auf Tyrosin wurde mit Millons Reagens geprüft, nachdem die Substanz durch tropfenweisen Zusatz verdünnter Salpeter-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 32, 94 (1901).

säure zur Lösung gebracht war.) Dagegen enthält es noch andere Amidosäuren, da eine Probe, in Wasser suspendiert und, mit Kupferkarbonat gekocht, ein blaugefärbtes Filtrat gab. Stets enthält es geringe Mengen freien Schwefels. Durch wiederholtes Umkrystallisieren aus ammoniakalischer Lösung wird es völlig rein erhalten.

Nach dieser Methode wurden aus je 2 kg Hornspänen folgende Ausbeuten erhalten:

1. 2 kg Hornspäne lieferten 56 g Cystin,
2. 2 kg derselben Hornspäne lieferten 57 g Cystin,
3. 2 kg anderer Hornspäne lieferten 19 g Cystin,
4. 2 kg Hornspäne (derselben wie in Darstellung 3) lieferten 26 g Cystin,
5. 2 kg anderer Hornspäne lieferten 36 g Cystin, von denen 19 g sich aus schwach ammoniakalischer Lösung, 17 g aus essigsaurer Lösung abschieden.

Nachdem Mörner mitgeteilt hatte, dafs die Menschenhaare besonders reichlich Cystin enthalten — er konnte 12,6 Proz. Cystin daraus darstellen —, stellte ich mir das Cystin ausschliefslich aus Menschenhaaren dar.

Zu diesem Zwecke wurden 500 g Haare in derselben Weise wie die Hornspäne zersetzt. Das nach dem Neutralisieren und Entfärben ausfallende Produkt bestand aber hier so reichlich aus Cystin und enthielt so wenig Tyrosin, dafs ein wiederholtes Umkrystallisieren aus ammoniakalischer Lösung genügte, um zu einem reinen Präparate zu gelangen. Auffällig war hier in anbetracht der kurzen Zersetzungsdauer das reichliche Auftreten von nadelförmigem Cystin unter den Zersetzungsprodukten, das sich mikroskopisch vom Tyrosin leicht durch seine stärkere Lichtbrechung und durch ihm eigentümliche schräg abgeschnittene Spitzen unterscheiden läfst. Jedoch verschwand das nadelförmige Produkt beim Umkrystallisieren, und das zur Untersuchung kommende Cystin bestand wie das aus Hornspänen dargestellte aus Rosetten von sechsseitigen Tafeln.

2. Beschreibung einiger Derivate des Cystins.

A. Cystinäthylesterchlorhydrat.

Dieser Körper wurde dargestellt, weil in der Karboxylgruppe substituierte Derivate des Cystins noch nicht beschrieben worden sind und nach Analogie mit den Aminosäuren zu erwarten war, in dem salzsauren Salze des Cystinäthylesters ein gut krystallisierendes Derivat des Cystins zu erhalten.

Cystin wird in abs. Alkohol suspendiert und Salzsäure eingeleitet, bis alles gelöst ist. Die Lösung erfolgt sehr langsam und unter starker Erwärmung. Nachdem zum Schlufs eine halbe Stunde auf dem Wasserbade erwärmt worden ist, wird die Lösung unter vermindertem Druck

auf ungefähr 50 ccm eingeengt. Beim Stehen krystallisiert ein Teil des salzsauren Esters aus, der in Lösung bleibende Anteil kann durch Zusatz von Äther aus der Mutterlauge der ersten Krystallisation gewonnen werden. Zur Reinigung wird der Körper in wenig Alkohol gelöst und durch vorsichtigen Zusatz von Äther zur Krystallisation gebracht.

Das wiederholt umkrystallisierte Produkt bildet schneeweifse Nadeln, die teils frei, teils büschelförmig vereinigt sind. Beim raschen Erhitzen zersetzt es sich bei 185° unter Bräunung und Gasentwickelung. Auch bei andauerndem Erhitzen auf 110° im Trockenschrank findet Zersetzung statt, die Substanz sintert dabei stark zusammen, färbt sich braun und bedeckt zum Schlufs als braune Kruste den Boden des Gefäfses. Sie hat jetzt einen eigentümlichen, süfslichen Geruch, löst sich nicht mehr im Wasser, sondern giebt an dasselbe nur Ammoniumchlorid ab. In Salzsäure ist der braune Rückstand unlöslich und wird beim Erwärmen mit Salzsäure ölig, dagegen löst er sich zum Teil in Natronlauge.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 100° getrocknet.

0,1487 g Substanz gaben 0,1582 g Ag Cl, entspr. 26,30 Proz. Cl.
0,1151 g Substanz verbrauchten 5,78 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure, entspr. 0,00809 g N oder 7,03 Proz. N.

Berechnet für $C_{10}H_{20}N_2O_4S_2 + 3HCl$	Gefunden
Cl 26,21 Proz.	26,30 Proz.
N 6,92 „	7,03 „

Ob der leicht zu gewinnende und durch grofses Krystallisationsvermögen ausgezeichnete salzsaure Cysteinäthylester ebenfalls mehr Salzsäure zu binden vermag, als seinem Stickstoffgehalt entspricht, wurde nicht untersucht, dagegen überzeugte ich mich, dafs sowohl das Cystinchlorhydrat wie das Cysteinchlorhydrat normal zusammengesetzt sind.

0,2552 g Cystinchlorhydrat gaben 0,2402 g Ag Cl, entspr. 23,27 Prozent Cl.

Berechnet für $C_6H_{12}N_2S_2O_4 + 2HCl$	Gefunden
Cl 22,64 Proz.	23,27 Proz.

0,1736 g Cysteinchlorhydrat gaben 0,1583 Ag Cl, entspr. 22,55 Prozent Cl.

Berechnet für $C_3H_8NSO_2 + HCl$	Gefunden
Cl 22,50 Proz.	22,55 Proz.

Es sei noch erwähnt, dafs der salzsaure Methylester des Cystins ebenfalls dargestellt wurde, derselbe ist aber so hygroskopisch, dafs er nicht analysiert werden konnte.

B. Cystinhydantoinsäure.

Bereits Brenzinger*) hatte versucht, durch Einwirkung von Kaliumcyanat auf Cystin eine Uraminosäure darzustellen. Beim Versuche, dieselbe zu reinigen, ging sie jedoch in das Anhydrid über, was durch die Analyse der erhaltenen Verbindung bestätigt wurde. Es schien jedoch von Interesse, von neuem zu versuchen, die freie Säure, wenigstens in Form eines ihrer Salze darzustellen, da möglicherweise diese Verbindung physiologische Bedeutung haben konnte. Denn die Bildung von Uraminosäuren ist ein synthetischer Prozefs, der vom tierischen Organismus mit Leichtigkeit vollzogen wird, und da das Cystein im intermediären Stoffwechsel beim Abbau und Zerfall der Eiweifskörper gebildet werden kann, im normalen Harn aber stets eine wenn auch nur sehr geringe Menge einer bleischwärzenden Schwefelverbindung nachzuweisen ist, so ist an die Möglichkeit zu denken, dafs ein Teil des Cystins vielleicht als Uraminosäure zur Ausscheidung gelangt, um so mehr als nach den Untersuchungen von Salkowski**) ein anderer schwefelhaltiger Körper, der im intermediären Stoffwechsel eine hervorragende Rolle spielt, das Taurin, als Taurokarbaminsäure ausgeschieden wird.

Es wurde versucht, das Baryumsalz der Cystinuraminosäure darzustellen, um einige Reaktionen dieses Körpers kennen zu lernen.

a) Baryumsalz.

3 g Cystin werden in 108 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure suspendiert, und zu dem schwach erwärmten Gemenge 2 g Kaliumcyanat, gelöst in 25 ccm Wasser, gefügt. Es findet unter Erwärmung und Gasentwickelung lebhafte Reaktion statt, wobei die Flüssigkeit alkalische Reaktion annimmt. Die alkalische Reaktion wird mit Schwefelsäure abgestumpft, eine Operation, die einige Male wiederholt werden mufs, da das Reaktionsgemenge sehr bald von neuem alkalisch reagiert. Nach $1^1/_2$ stündiger Einwirkung wird zu der Flüssigkeit noch 1 g Kaliumcyanat hinzugefügt, nach einer weiteren Stunde dieselbe Menge noch einmal. Nachdem nun alles Cystin gelöst ist, wird die hellbraune Flüssigkeit 12 Stunden sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit wird die Schwefelsäure durch Eintragen von Baryt entfernt, wobei sich ein schwacher Ammoniakgeruch bemerkbar macht. Der überschüssige Baryt wird durch Kohlensäure entfernt und die von Baryumsulfat und Baryumkarbonat befreite, alkalisch reagierende Flüssigkeit durch Zusatz von viel Alkohol gefällt. Es bildet sich ein reichlicher flockiger

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 16, 576 (1892).

**) Virchows Archiv 58, 461 (1873) und Ber. d. deutsch. chem. Ges. 6, 749 u. 1312 (1873).

Niederschlag, der wegen seiner gallertigen Konsistenz nicht abzusaugen ist. Nachdem sich derselbe völlig abgesetzt hat, wird er filtriert und mit verdünntem Alkohol bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion ausgewaschen. Der auf dem Filter befindliche Körper giebt mit alkalischer Bleilösung starke Schwefelreaktion, das Filtrat dagegen keine. Der gut ausgewaschene Körper wird in wenig Wasser gebracht, in dem sich alles bis auf einen kleinen Rest von Baryumkarbonat löst. Da die konzentrierte Lösung auch bei längerem Stehen keine Neigung zum Krystallisieren zeigt, wird die Flüssigkeit von neuem mit Alkohol gefällt und der erhaltene schneeweifse Körper durch wiederholtes Auflösen in Wasser und Fällen mit Alkohol gereinigt.

Das so dargestellte Baryumsalz bildet im trockenen Zustande ein schneeweifses, amorphes Pulver, das stark hygroskopisch ist. Beim Stehen an der Luft wird es harzig und bildet eine gelbliche, glänzende Masse. In wässeriger Lösung reagiert es neutral, in festem Zustande auf rotes Lakmuspapier gebracht, hinterläfst es jedoch einen blauen Fleck. Es verbrennt, ohne sich aufzublähen, zunächst ohne Geruchentwickelung, später unter starkem Geruch nach verbrannten Haaren; daneben macht sich ein leichter Blausäuregeruch bemerkbar, der gegen Ende der Verbrennung vorwiegt.

0,1247 g im Vakuum getrockneter Substanz verlieren bei 110° 0,0048 g H_2O, entspr. 3,85 Proz. H_2O.

0,1353 g im Vakuum getrockneter Substanz verbrauchten bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl 11,12 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure, entspr. 0,01557 g N oder 11,51 Proz. N.

0,1199 g bei 110° getrockneter Substanz gaben 0,0602 g Baryumsulfat, entspr. 29,55 Proz. Ba.

Berechnet für $C_8H_{12}N_4S_2O_6Ba + H_2O$	Gefunden
H_2O 3,75 Proz.	3,85 Proz.
N 11,71 „	11,51 „
Berechnet für $C_8H_{12}N_4S_2O_6Ba$	Gefunden
Ba 29,76 Proz.	29,55 Proz.

Die Analysen bestätigen, dafs es sich um das Baryumsalz der Cystinhydantoinsäure handelt.

Sein Verhalten gegen einige gebräuchliche Reagentien ist folgendes:

Silbernitrat giebt eine weifse Fällung, die Flüssigkeit wird dabei stark sauer. Der entstandene Niederschlag wird rasch gelb und besteht unter dem Mikroskop betrachtet aus einer gelatinösen, von feinen Körnchen durchsetzten Masse. Er ist im Überschufs des Reagens unlöslich, wenig löslich in heifsem Wasser und färbt sich beim Kochen in wässeriger Lösung braunrot. Er ist leicht löslich in Ammoniak und Salpetersäure.

Eisenchlorid giebt einen voluminösen, amorphen Niederschlag von schmutzig graugelber Farbe, derselbe ist unlöslich in heifsem Wasser; in überschüssigem Reagens ist er in der Kälte ebenfalls unlöslich, jedoch löst er sich in demselben in der Wärme, um beim Erkalten teils körnig, teils gelatinös amorph wieder auszufallen.

Sublimat giebt einen weifsen Niederschlag, der sich beim Kochen zu grofsen Flocken zusammenballt. Er ist unlöslich in heifsem Wasser, unlöslich im Überschufs des Reagens und besteht aus körnigen, amorphen Massen.

Quecksilberoxydnitrat giebt einen reichlichen weifsen Niederschlag, der beim Stehen in der Kälte schon nach wenigen Minuten eine graue Farbe annimmt, die allmählich immer dunkler wird. Beim Kochen wird der Niederschlag schwarz.

Kupferacetat giebt keine Fällung.

Bleiacetat giebt eine geringe Trübung, die beim Schütteln verschwindet. Zusatz von Ammoniak bewirkt die Ausscheidung eines flockigen weifsen Niederschlages, der in überschüssigem Ammoniak unlöslich ist.

Phosphorwolframsäure zu der vom Baryum durch Schwefelsäure befreiten Lösung hinzugesetzt giebt keine Fällung.

b) Silbersalz.

0,5 g Baryumsalz der Cystinhydantoinsäure werden in Wasser gelöst und mit Silbernitrat versetzt, solange noch eine Fällung entsteht. Dabei wird die Reaktion stark sauer. Nach dem Absetzen wird der Niederschlag filtriert, mit Wasser gut ausgewaschen und das so erhaltene gelbe Pulver im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1081 g Substanz gaben 0,0599 g AgCl, entspr. 55,41 Proz. Ag.

0,1809 g Substanz verbrauchten bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl 8,72 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure, entspr. 0,01221 g N oder 6,75 Proz. N.

Berechnet für $C_8H_{12}N_4S_2O_6Ag_2 + Ag_2O$	Gefunden
Ag 55,92 Proz.	55,41 Proz.
N 7,27 „	6,75 „

3. Über die dem Cystin zu Grunde liegende Thiomilchsäure.

Bei Betrachtung der vier für das Cystin resp. für das Cystein möglichen Formeln ist es klar, dafs Formel 1 und Formel 2 sich von einer α-Thiomilchsäure ableiten, Formel 3 und Formel 4 von einer β-Thiomilchsäure. Eine Entscheidung über die Frage, welche von den beiden Thiomilchsäuren dem Cystin zu Grunde liegt, schien auf folgendem Wege möglich. Jochem*) hat in Hofmeisters Laboratorium gezeigt, dafs beim Behandeln von Aminosäuren in konzentriert salzsaurer Lösung mit Kaliumnitrit die Aminogruppe

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 31, 119 (1900).

mit Leichtigkeit gegen Chlor ausgetauscht werden kann. Bei der Übertragung dieser Reaktion auf das Cystin habe ich versucht, ein gechlortes, schwefelhaltiges, stickstofffreies Produkt zu erhalten, in der Hoffnung, aus dem gebildeten gechlorten Disulfid das Chlor durch nascierenden Wasserstoff herausreduzieren zu können und so zu der dem Cystin zu Grunde liegenden Thiomilchsäure zu gelangen.

A. Einwirkung von Natriumnitrit auf Cystin in konzentriert salzsaurer Lösung.

5 g Cystin werden in 50 ccm Salzsäure (spez. Gew. 1,19) suspendiert und unter guter Kühlung und kräftigem Schütteln tropfenweise mit einer konzentrierten Lösung von 10 g Natriumnitrit versetzt. Die zu Anfang träge verlaufende Reaktion nimmt allmählich bei Zusatz von mehr Natriumnitrit an Intensität zu, es findet reichliche Gasentwickelung statt, die andauert, nachdem die gesamte Natriumnitritlösung eingetragen ist. Die Operation dauert ungefähr eine Stunde. Das Reaktionsgemenge wird 12 Stunden bei Zimmertemperatur sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit wird die überschüssige salpetrige Säure und das Stickoxyd durch Hindurchleiten von Luft vertrieben, die Flüssigkeit vom ausgeschiedenen Kochsalz und wenig unangegriffenem Cystin befreit und mit Äther wiederholt ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung ist hellgelb gefärbt. Nach Abdestillieren des Äthers hinterbleibt eine geringe Menge eines braunen Öls, das die gesuchte Chlorverbindung darstellt. Es ist anzunehmen, dafs dieselbe eine Dichlordithiodilaktylsäure ist.

Die Verbindung reagiert stark sauer und besitzt einen eigentümlichen, an Katzenharn erinnernden Geruch. Sie ist unlöslich in Schwefelkohlenstoff, schwer löslich in Wasser, leicht löslich in Alkohol, Äther, Ligroin, Chloroform, Benzol und Essigäther. Eine Probe, in Natronlauge gelöst, giebt mit alkalischer Bleilösung eine enorme Schwefelreaktion; dabei entweicht kein Ammoniak. Die wässerige Lösung giebt mit Silbernitrat eine gelbe, langsam entstehende Fällung, die in Salpetersäure löslich ist. Mit Salpetersäure und Silbernitrat entsteht in der Kälte eine ganz geringe Trübung. Beim Stehen wird jedoch nach mehreren Stunden reichlich Chlorsilber ausgeschieden. Die Chlorabspaltung erfolgt sofort beim Kochen der Säure mit Salpetersäure und Silbernitrat.

Kupfersulfat bewirkt keine Veränderung. Auf Zusatz von Eisenchlorid zu der wässerigen Lösung der Säure entsteht ein heller gelbbrauner Niederschlag, der im Überschufs des Reagens unlöslich ist.

Die beiden letzten Reaktionen zeigen die Abwesenheit einer Thiomilchsäure an.

Versuche, durch Darstellung von Salzen die Verbindung in eine analysenfähige Form überzuführen, fielen negativ aus.

Bei der Destillation unter gewöhnlichem Druck trat völlige Zersetzung ein.

B. Reduktion der Dichlordithiodilaktylsäure.

Die aus 15 g Cystin erhaltene Säure wird, nachdem sie wiederholt mit Wasser gewaschen und mit Äther aufgenommen ist, in 400 ccm verdünnter Salzsäure suspendiert und allmählich Zinkstaub (20 g) in die Lösung eingetragen. Nachdem eine halbe Stunde reichlich Gasentwickelung stattgefunden hat, wird noch eine weitere halbe Stunde auf dem Wasserbade gelinde erwärmt. Die anfangs gelbe Flüssigkeit ist während der Reduktion wasserklar geworden, der eigentümliche Geruch des gechlorten Disulfids ist verschwunden und an seine Stelle ein penetranter, widerlicher Geruch getreten. Die erkaltete Flüssigkeit wird wiederholt mit Äther ausgeschüttelt. Nach Abdestillieren des Äthers hinterbleibt ein Öl, das nach Aufnehmen desselben mit Wasser starke Schwefelreaktion mit alkalischer Bleilösung giebt und mit Eisenchlorid eine prachtvolle, rasch verschwindende Blaufärbung zeigt.

Mit dieser Reaktion war die Anwesenheit einer Thiomilchsäure wahrscheinlich gemacht, und es handelte sich darum, zu entscheiden, ob dieselbe α- oder β-Thiomilchsäure wäre. Charakteristisch für α-Thiomilchsäure ist ihr Verhalten gegen Kupfersulfat. Während nämlich β-Thiomilchsäure mit Kupfersulfat keine Farbenreaktion, sondern nur einen amorphen, gelben Niederschlag giebt, erzeugt die α-Thiomilchsäure eine prachtvolle tief violette, bleibende Färbung. Die vorliegende Thiomilchsäure gab nun mit Kupfersulfat keine violette Färbung, sondern einen gelben, amorphen Niederschlag. Dieses Verhalten sprach also für die Anwesenheit einer β-Thiomilchsäure; jedoch macht bereits Lovén darauf aufmerksam, dafs die Farbenreaktion der α-Thiomilchsäure mit Kupfersulfat durch die Gegenwart von Zinksalzen verhindert wird. Diese waren aber stets in dem erhaltenen Reaktionsprodukt nachzuweisen, so dafs es voreilig erschien, aus dem Ausbleiben der Farbenreaktion einen Schlufs über die Konstitution der erhaltenen Thiomilchsäure zu ziehen.

Für die Abscheidung und Erkennung der α-Thiomilchsäure ist von Suter die Überführung der Thiomilchsäure in Benzylthiomilchsäure mit gutem Erfolge benutzt worden. Aber trotz

peinlichstem Einhalten der von Suter gegebenen Vorschrift gelang es mir nicht, ein Benzylprodukt zu erhalten. Nach Ausäthern des überschüssigen Benzylchlorids fand auf Zusatz von Salzsäure nur eine ganz minimale Trübung statt, die nach wochenlangem Stehen im Eisschrank nur Spuren eines Niederschlages als Bodensatz absetzte. Der Nachweis der α-Thiomilchsäure auf diesem Wege ist also ebenfalls als gescheitert zu betrachten.

Ein anderer Weg, die Frage nach der Natur der vorliegenden Thiomilchsäure zur Entscheidung zu bringen, lag in der Überführung derselben in die entsprechende Dithioverbindung. Die in Frage kommenden Verbindungen unterscheiden sich sowohl durch Krystallform wie durch Schmelzpunkt scharf voneinander. Während die α-Dithiodilaktylsäure in Nadeln vom Schmelzpunkt 141° krystallisiert, krystallisiert die β-Dithiodilaktylsäure in Blättchen vom Schmelzpunkt 153 bis 154°.

Zur Ausführung des Versuches wird das vom Äther befreite Öl mit $^3/_4$ Liter Wasser aufgenommen und mit Eisenchlorid tropfenweise versetzt, solange noch eine Blaufärbung entsteht. Es bildet sich dabei ein geringer flockiger Niederschlag, der nach 24 stündigem Stehen abgesaugt wird; seine Menge ist zu gering, um untersucht werden zu können. Das trübe Filtrat wird bei Zimmertemperatur der freiwilligen Verdunstung überlassen. Nach 3 Monaten hat sich ein Bodensatz von Krystallen gebildet, die abfiltriert und in heifsem Wasser gelöst werden. Die wässerige Lösung scheidet beim Stehen prachtvolle Rosetten von Krystallen aus, die nach zweimaligem Umkrystallisieren unter dem Mikroskop betrachtet als Blättchen erscheinen, die im trockenen Zustande einen schönen Silberglanz besitzen. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 151°. Nach nochmaligem Umkrystallisieren aus Wasser zeigen sie den Schmelzpunkt 154°, der jetzt bei erneutem Umkrystallisieren konstant bleibt. Die vereinigten Mutterlaugen werden im Vakuum konzentriert und liefern dabei eine zweite Krystallisation desselben Körpers, der nach wiederholtem Umkrystallisieren ebenfalls bei 154° schmilzt.

Krystallform und Schmelzpunkt sprechen also für die β-Dithiodilaktylsäure.

Auch die nach v. Asboth ausgeführte Schwefelbestimmung bestätigt, dafs die vorliegende Substanz eine Dithiodilaktylsäure ist.

0,1262 g Substanz gaben 0,2803 g $BaSO_4$ entsprechend 30,50 Proz. S.

Berechnet für $C_6H_{10}S_2O_4$	Gefunden
S 30,50 Proz.	30,50 Proz.

Die im Vakuum getrocknete Substanz nimmt beim Trocknen bei 110° nicht an Gewicht ab.

In einem zweiten Versuche wurde die der Reduktion zu unterwerfende Dichlorthiodilaktylsäure durch Eintröpfeln einer konzentrierten

Lösung von 14 g Kaliumnitrit unter Eiskühlung in 300 ccm konzentrierter Salzsäure, in der 12 g analysenreines Cystin durch kräftiges Rühren mittelst Turbine in feiner Suspension gehalten wurden, dargestellt. Die erhaltene Dichlordithiodilaktylsäure wurde bei Wasserbadtemperatur durch Zinn und Salzsäure so lange reduziert, bis die wässerige Flüssigkeit beim Erkalten völlig klar blieb. Die ausgeätherte Thiomilchsäure wurde nach Abdestillieren des Äthers in 10 ccm Wasser aufgenommen und durch vorsichtigen Zusatz von Eisenchloridlösung oxydiert. Die nach kurzer Zeit ausgeschiedenen Krystalle wurden abgesaugt und aus wenig heifsem Wasser zweimal umkrystallisiert. Sie bildeten schöne grofse Blättchen vom Schmelzpunkt 154°.

Auch die Elementaranalyse der bei 105° getrockneten Substanz ergab die für eine Dithiodilaktylsäure verlangten Werte.

0,1426 g Substanz gaben 0,1790 g CO_2, entspr. 34,22 Proz. C und 0,0617 g H_2O, entspr. 4,84 Proz. H.

Gefunden	Berechnet
34,22 Proz. C	34,20 Proz. C
4,84 „ H	4,79 „ H

Um die Natur der erhaltenen Verbindung als β-Dithiodilaktylsäure völlig sicher zu stellen, wurde zum Vergleich die entsprechende synthetisch durch Einwirkung von Kaliumsulfhydrat auf β-Jodpropionsäure zu gewinnende Säure dargestellt. Die durch Abbau des Cystins erhaltene Säure und die synthetisch dargestellte Verbindung zeigten in ihren Eigenschaften völlige Übereinstimmung. Beide Körper allein, wie ein Gemisch gleicher Teile am selben Thermometer gleichzeitig erhitzt, schmolzen scharf bei 154°, so dafs die Identität der beiden Dithiodilaktylsäuren aufser Zweifel gestellt ist.

Mit dem Nachweis, dafs die dem Cystin zu Grunde liegende Thiomilchsäure der β-Reihe angehört, bleiben für die Konstitution des Cystins und des Cysteins nur zwei Möglichkeiten übrig, die von dem Eintrittsort der Aminogruppe in diesen Körper abhängig sind.

1.	2.
$CH \cdot <^{SH}_{NH_2}$	$CH_2 \cdot SH$
CH_2	$CH.NH_2$
$COOH$	$COOH$

4. Über die Stellung der Aminogruppe im Cystin.

Betrachtet man die obigen Formeln, so sieht man, dafs sich Formel 1 von einer β-Aminosäure, Formel 2 von einer α-Aminosäure ableitet. Vergegenwärtigt man sich, dafs die in der Natur vorkommenden Monoaminosäuren, soweit sie bisher bekannt sind,

α-Aminosäuren sind, so erscheint es von vornherein wahrscheinlich, dafs das Cystin das Disulfid eines nach Formel 2 gebauten Merkaptans ist. Diese letztere Vorstellung gewinnt an Interesse durch die physiologische Beziehung, die ein der Formel 2 entsprechendes Cystin zu einem anderen stickstoff- und schwefelhaltigen Körper eröffnet, der im intermediären Stoffwechsel beständig gebildet wird, nämlich dem Taurin, denn durch Oxydation der Thiogruppe zur Sulfogruppe unter Absprengung der entständigen Karboxylgruppe wäre ein direkter Weg gegeben, um vom Cystein zum Taurin zu gelangen.

$$\begin{array}{l} CH_2.SH \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{l} CH_2.SO_3H \\ | \\ CH_2.NH_2 \end{array}$$

Abgesehen von dem physiologischen Interesse, dafs diese Überführung von Cystin oder Cystein in Taurin darbietet, würde damit auch endgültig die Frage nach der Konstitution des Cystins gelöst sein, denn nachdem die dem Cystin zu Grunde liegende Thiomilchsäure als β-Thiomilchsäure erkannt ist, würde dieser Übergang die α-Stellung der Aminogruppe beweisen.

A. Oxydation des Cystins zur Cysteinsäure.

Nach vielen vergeblichen Versuchen, ein geeignetes Oxydationsmittel für das Cystin zu finden, wurde im Brom ein Mittel gefunden, das den locker gebundenen, bleischwärzenden Schwefel des Cystins leicht und glatt in oxydierten, festgebundenen Schwefel überführt, ohne bei dieser Oxydation tief greifende Veränderungen hervorzurufen. Das dabei entstehende Produkt will ich der Kürze halber und aus Gründen, die später klar werden, Cysteinsäure nennen.

Der zuerst eingeschlagene Weg, dieselbe [zu isolieren, war folgender.

a) Isolierung der Cysteinsäure als Baryumsalz.

3 g Cystin werden in 300 ccm Wasser suspendiert und tropfenweise mit Brom versetzt. Das Cystin wird rasch gelöst, Brom reichlich verbraucht; es findet lebhafte Erwärmung statt. Mit dem Bromzusatz wird unter kräftigem Schütteln fortgefahren, bis der sich bildende Schüttelschaum gelb gefärbt ist. Eine Probe, der Flüssigkeit entnommen, zeigt, dafs der bleischwärzende Schwefel verschwunden ist, eine geringe Schwefelsäurebildung hat stattgefunden. Brom und überschüssiger Bromwasserstoff werden durch Bleiacetat entfernt, der

erhaltene Niederschlag wird rasch abgesaugt, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entbleit und auf dem Wasserbade konzentriert. Dabei bräunt sich die Flüssigkeit beträchtlich. Nach mehrtägigem Stehen wird die stark konzentrierte Lösung von einem geringfügigen, bräunlichen, flockigen Niederschlag filtriert, das Filtrat auf 350 ccm gebracht und mit Baryumkarbonat 1 Stunde gekocht. Nachdem vom unangegriffenen Baryumkarbonat abfiltriert worden ist, wird das erkaltete Filtrat mit 800 ccm 95 proz. Alkohol versetzt. Es entsteht ein voluminöser, flockiger Niederschlag, der nach 24 stündigem Stehen abgesaugt wird und mit verdünntem Alkohol (1 Tl. Alkohol von 95 Proz., 2 Tle. Wasser) ausgewaschen wird. Derselbe wird in Wasser gelöst, von wenig ausgeschiedenem Baryumkarbonat abfiltriert und von neuem mit Alkohol gefällt. Der viermal umgefällte Körper wird unter absoluten Alkohol gebracht, unter dem er bald körnige Konsistenz annimmt, ohne aber deutliche Krystallisation zu zeigen.

Der Körper ist schneeweifs, löst sich leicht zu einer vollkommen klaren, alkalisch reagierenden Flüssigkeit in Wasser, kann aber daraus nicht durch Konzentrieren der Lösung zur Krystallisation gebracht werden. Die stark eingeengte Flüssigkeit behält firnisartige Beschaffenheit, die sie selbst bei langem Aufbewahren im Vakuum über Schwefelsäure nicht verliert. Die Ausbeute aus 3 g Cystin betrug 3,5 g analysenreines Produkt.

Der Körper enthält reichlich Baryum. Er giebt mit alkalischer Bleilösung keine Schwefelreaktion mehr. Eine Probe, mit Soda und Salpeter geschmolzen, entwickelt reichlich Ammoniak. Die Schmelze löst sich nicht vollkommen im Wasser, der Rückstand erweist sich als Baryumsulfat. Im Filtrat vom Baryumsulfat ist Schwefelsäure nachzuweisen. Eine Probe auf eingetretenes Brom fällt negativ aus.

Dieses Verhalten zeigt, dafs es sich um das Baryumsalz einer stickstoff- und schwefelhaltigen Substanz handelt, und da vom Cystin — also einem Disulfid — ausgegangen war, und Disulfide bei kräftiger Oxydation in Disulfoxyde übergehen, lag es nahe, zu vermuten, dafs der vorliegende Körper das Baryumsalz des Disulfoxyds des Cystins darstellte. Aus den erhaltenen Analysenzahlen liefs sich dieser Schlufs nicht ziehen.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,0954 g Substanz gaben 0,0499 g $BaSO_4$, entspr. 30,79 Proz. Ba.

0,1483 g Substanz verbrauchten bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 6,85 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure, entspr. 0,00959 g N oder 6,47 Proz. N.

0,1632 g Substanz gaben bei der Schwefelbestimmung nach v. Asboth 0,1652 g $BaSO_4$, entspr. 13,90 Proz. S.

	Berechnet für $C_6H_{10}N_2S_2O_8Ba$	Gefunden
Ba	31,25 Proz.	30,79 Proz.
N	6,39 „	6,47 „
S	14,58 „	13,90 „

Auch mit dem Baryumsalz einer etwa aus dem Cystin gebildeten Sulfosäure zeigten die Analysenzahlen keine ausreichende Übereinstimmung.

Berechnet für $C_6H_{10}N_2S_2O_{10}Ba$	Gefunden
Ba 29,01 Proz.	30,79 Proz.
N 5,93 „	6,47 „
S 13,54 „	13,90 „

Man gewinnt vielmehr den Eindruck, dafs es sich um das Baryumsalz eines Körpers handelt, dessen Zusammensetzung zwischen Disulfoxyd und Sulfosäure liegt. Das eine geht aus den erhaltenen Zahlen mit Sicherheit hervor, dafs in dem vorliegenden Körper das Verhältnis von Ba:N:S wie 1:2:2 ist.

Nachdem das Baryumsalz nicht ausreichenden Aufschlufs über die Natur des erhaltenen Produktes gegeben hatte, wurde versucht, die freie Cysteinsäure darzustellen.

b) Darstellung der freien Cysteinsäure und Reinigung derselben durch Umkrystallisieren.

Die Versuche, die freie Cysteinsäure darzustellen, führten rasch zum Ziel, als von völlig reinem Cystin ausgegangen wurde. Bei Verunreinigung des Cystins durch andere Aminosäuren erhält man ölige, nicht krystallisierende Körper, aus denen die Cysteinsäure nur auf einem später zu beschreibenden Umweg isoliert werden kann.

Die Oxydation des Cystins mit Brom wird in derselben Weise vorgenommen wie oben, nur wird ein Überschufs von Brom sorgfältig vermieden. Nach beendeter Oxydation wird zur Verjagung des gebildeten Bromwasserstoffs auf dem Wasserbade eingedampft. Die zurückbleibende, leicht bräunlich gefärbte Krystallmasse wird mit absolutem Alkohol gut verrieben und, sobald der Alkohol keine Verunreinigungen mehr aufnimmt, aus heifsem Wasser wiederholt umkrystallisiert. Bei langsamem Auskrystallisieren aus Wasser beobachtet man häufig das Auftreten von zwei verschiedenen Krystallformen. Die zuerst auskrystallisierenden Mengen sind oktaedrische Gebilde, die später sich ausscheidenden Krystalle zeigen schöne, langgestreckte prismatische Formen und sind teils frei, teils zu Drusen angeordnet. Beim Umkrystallisieren der oktaedrischen Gebilde werden jedoch wieder nadelförmige Krystalle erhalten, die sich als identisch mit jenen der später auskrystallisierten Fraktion erwiesen, Verhältnisse, auf die später ausführlich eingegangen werden soll.

Zur Analyse gelangte ein Präparat, das viermal umkrystallisiert war, aus schneeweifsen Nadeln bestand und unter dem Mikroskop betrachtet einheitlich erschien. Es wurde bei 110° getrocknet und analysiert.

0,1330 g Substanz gaben 0,1073 g CO_2, entspr. 22,00 Proz. C
und 0,0538 g H_2O, „ 4,52 „ H.
0,1519 g Substanz gaben 0,1223 g CO_2, „ 21,96 „ C
und 0,0562 g H_2O, „ 4,14 „ H.

0,1459 g verbrauchten bei der N-Bestimmung nach Kjeldahl 8,79 ccm $^1/_{10}$ N-Schwefelsäure, entspr. 0,01231 g N oder 8,44 Proz. N.

0,2146 g Substanz gaben bei der S-Bestimmung nach Liebig 0,3079 g BaSO, entspr. 19,70 Proz. S.

Dasselbe Präparat wurde noch zweimal umkrystallisiert, bei 110° getrocknet und von neuem analysiert.

0,1947 g Substanz gaben 0,1531 g CO_2, entspr. 21,45 Proz. C
und 0,0759 g H_2O, „ 4,36 „ H.
0,1719 g Substanz gaben 13,39 ccm N (21,5°, 756 mm),
entspr. 8,82 Proz. N.
0,1537 g Substanz gaben bei der S-Bestimmung nach v. Asboth
0,2186 g $BaSO_4$, entspr. 19,53 Proz. S.

Ein zweites Präparat, das ebenfalls wiederholt umkrystallisiert war und völlig rein erschien, gab beim ersten Analysieren folgende Zahlen:

0,1650 g Substanz gaben 0,1286 g CO_2, entspr. 21,72 Proz. C
und 0,0737 g H_2O, „ 5,10 „ H.
0,1471 g Substanz gaben 11,2 ccm N (20°, 754 mm),
entspr. 8,64 Proz. N.

Nach erneutem Umkrystallisieren wurden folgende Analysenwerte erhalten:

0,1838 g Substanz gaben 0,1457 g CO_2, entspr. 21,62 Proz. C
und 0,0723 g H_2O, „ 4,40 Proz. H.
0,1684 g Substanz gaben bei der S-Bestimmung nach Liebig
0,2330 g $BaSO_4$, entspr. 19,00 Proz. S.

	C Proz.	H Proz.	N Proz.	S Proz.
Präparat 1	22,00	4,52	8,44	19,70
„	21,96	4,14	—	—
„ umkrystallisiert . . .	21,45	4,36	8,82	19,56
Präparat 2	21,72	5,10	8,64	—
„ umkrystallisiert . . .	21,62	4,40	—	19,00
Berechnet für $C_6H_{12}N_2S_2O_8$ . . .	23,65	3,97	9,23	21,07 (Disulfoxy
Berechnet für $C_3H_7NSO_5$	21,28	4,17	8,30	18.96 (Sulfosäure)

Ein Blick auf diese Tabelle zeigt, dafs die bei der Oxydation des Cystins mit Brom entstandene Cysteinsäure in keinem Falle dem erwarteten Disulfoxyd entspricht, vielmehr scheint das erhaltene

Produkt die Sulfosäure des Cysteins darzustellen. In diesem Falle müfste bei der Oxydation eine Sprengung der Disulfidbindung stattgefunden haben unter Bildung von 2 Sulfosäuremolekülen aus 1 Cystinmolekül.

$$\begin{array}{ll} CH_2\cdot S - S\cdot CH_2 & \\ | \qquad\qquad | & \\ CH\cdot NH_2 \quad CH.NH_2 & \\ | \qquad\qquad | & \\ COOH \quad COOH & \end{array} \longrightarrow \begin{array}{ll} CH_2.SO_3H & HO_3S\cdot CH_2 \\ | & \qquad | \\ CH.NH_2 & \qquad CH.NH_2 \\ | & \qquad | \\ COOH & \qquad COOH \end{array}$$

Ein solches Verhalten ist ohne Analogie mit dem Verhalten der übrigen Disulfide gegen kräftige Oxydationsmittel. Es ist aber zu berücksichtigen, dafs eine völlige Analogie gar nicht zu erwarten ist, da das Cystin das einzige bisher bekannte amidierte Disulfid der Fettreihe darstellt.

Um die Frage nach der chemischen Natur der Cysteinsäure zu entscheiden, habe ich mich bemüht, auf einem anderen Wege als durch wiederholtes Umkrystallisieren eine Reinigung der Cysteinsäure vorzunehmen, da bei dieser Art der Reinigung das Material zu stark zusammenschmolz, ohne dafs man eine Gewähr für die endgültige Reinheit des erhaltenen Produktes erhielt. Als beobachtet wurde, dafs die Cysteinsäure beim Kochen mit Kupferhydroxyd ein äufserst schwer lösliches Kupfersalz lieferte, wurde dieses in gröfserer Menge dargestellt und hieraus die Cysteinsäure in Freiheit gesetzt.

c) Reinigung der Cysteinsäure über das Kupfersalz.

Rohe Cysteinsäure (15 g) wird in 600 ccm Wasser gelöst und in die Lösung Kupferhydroxyd im Überschufs eingetragen. Das Ganze wird eine halbe Stunde am Rückflufskühler gekocht. Vom Ungelösten wird heifs abfiltriert und der Rückstand so lange mit Wasser ausgekocht, bis das ablaufende Filtrat farblos ist. Die vereinigten tiefblauen Filtrate werden stark konzentriert. Beim Eindampfen scheidet sich das Kupfersalz als krystallinische, harte Kruste am Boden der Schale aus. Nach dem Erkalten werden die Krystalle abgesaugt, mit kaltem Wasser wiederholt verrieben und schliefslich durch längeres Dekantieren mit Wasser gereinigt. Hierauf werden sie in 300 ccm Wasser suspendiert und durch Hinzufügen von verdünnter Salzsäure zur Lösung gebracht. Nach Entfernung des Kupfers durch Schwefelwasserstoff wird das wasserhelle Filtrat durch Hindurchleiten von Luft vom überschüssigen Schwefelwasserstoff befreit und auf dem Wasserbade eingeengt. Die konzentrierte Lösung setzt beim langsamen Auskrystallisieren prachtvolle, schön ausgebildete Krystalle ab, die ausschliefslich der oben erwähnten oktaedrischen Modifikation angehören. Diese erste Krystallisation beträgt 4,5 g.

Durch weiteres Einengen der Mutterlauge wird eine zweite

Krystallisation von 7,5 g erhalten, die ein Gemenge der oktaedrischen Form und der prismatischen darstellt.

Aus den letzten Mutterlaugen schliefslich werden noch 2 g aus Nadeln bestehender Krystalle erhalten.

Untersuchung der ersten Krystallisation.

Da ich wiederholt beobachten konnte, dafs die oktaedrischen Gebilde beim Umkrystallisieren in die prismatische Form übergehen, und es mir nur vereinzelt gelang, aus den Nadeln beim Umkrystallisieren die oktaedrische Modifikation zurückzugewinnen, so wurde vorläufig eine Reinigung der ersten Fraktion durch Umkrystallisieren nicht vorgenommen.

Da von einem optisch aktiven Körper und zwar einem stark linksdrehenden ausgegangen war, liefs das Auftreten von zwei verschieden krystallisierenden Körpern bei der Oxydation daran denken, dafs möglicherweise dieses Verhalten in der Bildung von inaktivem neben aktivem Produkt eine Erklärung finden könnte. Eine Inaktivierung von ursprünglich aktiver Substanz schien insofern möglich zu sein, weil nach der Darstellung die Substanz dem Einflufs konzentrierter Säure ausgesetzt war und eine Änderung der spezif. Drehung unter diesen Umständen wiederholt beobachtet worden ist.

Zur Bestimmung der spezif. Drehung wurden 1,8481 g bei 110° getrockneter Substanz auf 25 ccm Wasser gelöst und die Lösung in einem 2 dcm-Rohr im Halbschattenapparat untersucht. Der abgelesene Winkel war im Mittel von 11 Bestimmungen + 1° 17′.

Daraus berechnet sich

$$\alpha_{[D]} = + 8{,}66^{0}.$$

Ferner wurde untersucht, ob die Substanz Krystallwasser enthält. Es stellte sich heraus, dafs dies nicht der Fall ist, die lufttrockene Substanz verändert ihr Gewicht bei andauerndem Erhitzen bei 110 bis 120° nicht.

Beim Umkrystallisieren der oktaedrischen Gebilde aus Wasser wurden schöne, gut ausgebildete, zu Drusen vereinigte Nadeln erhalten. Sie wurden über Schwefelsäure getrocknet. Die exsikkatortrockene Substanz enthält noch ein Molekül Krystallwasser, eine Thatsache, durch die die Verschiedenheit der beiden erwähnten Krystallformen eine Erklärung findet.

Zur Bestimmung der spezif. Drehung wurden 1,1063 g lufttrockener Substanz auf 15 ccm Wasser gelöst und die Lösung im 2 dcm-Rohr im Halbschattenapparate untersucht. Im Mittel von 5 Bestimmungen wurde der abgelesene Winkel zu + 1° 6′ gefunden.

Daraus ergiebt sich

$$\alpha_{[D]} = + 7{,}46^{0},$$

oder auf wasserfreie Substanz berechnet

$$\alpha_{[D]} = + 8{,}25^{0}.$$

Bei der Krystallwasserbestimmung und Elementaranalyse wurden folgende Zahlen erhalten:

0,2735 g lufttrockener Substanz verloren bei 110°
0,0266 g H_2O, entspr. 9,73 Proz. H_2O.
0,1754 g bei 110° getrockneter Substanz gaben
0,1370 g CO_2, entspr. 21,30 Proz. C
und 0,0658 g H_2O, „ 4,20 „ H.

Berechnet für $C_3H_7NSO_5 + H_2O$	Gefunden
H_2O 9,62 Proz.	9,73 Proz.
Berechnet für $C_3H_7NSO_5$	Gefunden
C 21,28 Proz.	21,30 Proz.
H 4,17 „	4,20 „

Untersuchung der zweiten Krystallisation.

Die durch Konzentration der Mutterlauge der wasserfreien Sulfosäure erhaltenen Krystalle, die ein Gemisch von wasserfreier und krystallwasserhaltiger Substanz darstellen, werden aus Wasser unter Salzsäurezusatz umkrystallisiert. Beim langsamen Auskrystallisieren erhält man schöne, lange Nadeln, die zwischen Fliefspapier getrocknet werden. Aus 7,5 g angewandtem Material werden 7 g durch Auskrystallisieren aus der sauren Lösung zurückgewonnen, der Rest durch vorsichtigen Alkoholzusatz.

0,1550 g lufttrockener Substanz verloren bei 110°
0,0144 g H_2O, entspr. 9,29 Proz. H_2O.
0,1867 g bei 110° getrockneter Substanz gaben
0,1449 g CO_2, entspr. 21,17 Proz. C
und 0,0700 g H_2O, „ 4,19 „ H.
0,1900 g bei 110° getrockneter Substanz gaben
13,79 ccm N (19,3°, 762 mm), entspr. 8,35 Proz. N.

0,1396 g bei 110° getrockneter Substanz gaben bei der S-Bestimmung nach v. Asboth 0,1919 g $BaSO_4$, entspr. 18,91 Proz. S.

Berechnet für $C_3H_7NSO_5 + H_2O$	Gefunden
H_2O 9,62 Proz.	9,29 Proz.
Berechnet für $C_3H_7NSO_5$	Gefunden
C 21,28 Proz.	21,17 Proz.
H 4,17 „	4,19 „
N 8,30 „	8,35 „
S 18,96 „	18,91 „

Zur Bestimmung der spezif. Drehung wurden 2,1194 g bei 110° getrockneter Substanz auf 20 ccm Wasser gelöst und die Lösung im Halbschattenapparat in einem 2 dcm-Rohr untersucht. Im Mittel von 5 Bestimmungen wurde ein Winkel von 1° 45′ abgelesen.

Daraus berechnet sich

$$\alpha_{[D]} = + 8,26^0.$$

Untersuchung der dritten Krystallisation.

Die dritte Fraktion hatte nach dem Umkrystallisieren ganz das Aussehen der übrigen Krystallisationen. Ich begnügte mich mit der Krystallwasserbestimmung der lufttrockenen Substanz.

0,1354 g Substanz verloren bei 110°
0,0128 g H_2O, entspr. 9,45 Proz. H_2O.

Berechnet für $C_3H_7NSO_5 + H_2O$	Gefunden
H_2O 9,62 Proz.	9,45 Proz.

Aus den letzten Mutterlaugen der dritten Krystallisation wurden durch starkes Einengen geringe Mengen eines öligen Produktes erhalten, das mit amorphen Partikelchen durchsetzt war. Jedoch reichten die erhaltenen Mengen zur weiteren Verarbeitung nicht aus.

In einem besonderen Versuche wurde die Ausbeute an Cysteinsäure aus Cystin nach Reinigung des ersteren über das Kupfersalz bestimmt.

3 g Cystin lieferten 3 g wasserfreie und 0,6 g wasserhaltige Cysteinsäure, was einer Ausbeute von 83 Proz. der theoretischen Menge entspricht.

Eine Zusammenfassung der bei der Oxydation des Cystins mit Brom erhaltenen Resultate zeigt folgendes Bild.

Das Cystin liefert bei der Oxydation mit Brom zu 83 Proz. einen stark sauer reagierenden Körper, dessen Analysenzahlen nach seiner Reinigung über das Kupfersalz ihn als die dem Cystein entsprechende Sulfosäure erscheinen lassen. Dieselbe krystallisiert in zwei Formen, einer oktaedrischen wasserfreien und einer prismatischen Form mit einem Molekül Krystallwasser. Obgleich sie aus dem Cystin, einer stark linksdrehenden Substanz, dargestellt ist, ist sie mäfsig rechtsdrehend. Ihre wahrscheinliche Formel ist:

$$\begin{array}{l} CH_2 . SO_3H \\ | \\ CH \cdot NH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

wenngleich die Formel:

$$\begin{array}{l} CH{<}^{SO_3H}_{NH_2} \\ | \\ CH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

noch nicht völlig auszuschliefsen ist.

Sie stellt die erste in der aliphatischen Reihe erhaltene Aminosulfofettsäure dar.

Von ihren Eigenschaften sei hervorgehoben, dafs sie abweichend vom Cystin beim Kochen mit Alkali (Natronlauge sowohl

wie Barytwasser) weder Schwefelsäure noch Ammoniak abspaltet. Es ist hierzu erhöhter Druck und eine Temperatur über 100° nötig.

Sie ist gegen konzentrierte Salpetersäure ganz beständig, man kann sie mit derselben abrauchen, ohne sie zu verändern. Sie zeigt hierin ein dem Taurin ähnliches Verhalten.

Bei längerem Erhitzen auf 190° beginnt sie sich zu bräunen und zu zersetzen, unterhalb dieser Temperatur ist sie auch bei längerem Erhitzen beständig.

Bei raschem Erhitzen auf 260° zersetzt sie sich unter Bräunung, starkem Aufblähen und Entwickelung von schwefliger Säure, ebenso bläht sie sich beim Verbrennen enorm auf und hinterläfst eine voluminöse, leicht verbrennliche Kohle.

Zur weiteren Charakterisierung der Säure wurden einige Salze dargestellt.

d) Salze der Cysteinsäure.

Trotzdem die Cysteinsäure zwei saure Gruppen enthält, eine Karboxyl- und eine Sulfogruppe

$$\begin{array}{l} CH_2SO_3H \\ | \\ CHNH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

fungiert sie doch in ihren Salzen nur als einbasische Säure. Die eine der beiden sauren Gruppen ist also durch die gleichzeitig vorhandene Aminogruppe neutralisiert. Welche von beiden Gruppen, ob die Sulfo- oder Carboxylgruppe, konnte mit Sicherheit nicht entschieden werden. Gegen eine innere Salzbildung nach Art der Aminosäuren spricht vielleicht der Umstand, dafs es selbst beim Eintragen von Kupferhydroxyd in die wässerige Lösung der Sulfosäure nicht gelingt, einerseits den Sulfosäurerest an Kupfer zu binden, andererseits ein den Aminosäuren analoges Kupfersalz zu erhalten. Dagegen scheint der Körper gegen Baryum mit einem freien Sulforest zu reagieren, bei innerer Neutralisation der Aminogruppe und der Karboxylgruppe. Am wahrscheinlichsten erscheint es, dafs die Cysteinsäure je nach der Affinität zum eintretenden Metall, in dem einen Fall mit einer freien Karboxylgruppe, in dem anderen Falle mit einer freien Sulfogruppe reagiert, und ich möchte annehmen, dafs in dem dargestellten Kalium-, Kupfer- und Zinksalz das Metall in die Karboxylgruppe eingetreten ist, dagegen im Baryumsalz in die Sulfogrupppe, um so mehr als letzeres Salz auch in seiner sonstigen Zusammensetzung sich wesentlich von den übrigen Salzen unterscheidet.

Kaliumsalz.

2 g Cysteinsäure werden in etwa 50 ccm Wasser gelöst, mit einer wässerigen Kalilösung genau neutralisiert, die Lösung auf ein viertel Volumen konzentriert und bei Wasserbadtemperatur mit Alkohol versetzt, bis eine deutliche ölige Ausscheidung beginnt. Dieselbe wird mit der gerade genügenden Menge heifsen Wassers wieder zur Lösung gebracht. Beim langsamen Erkalten scheidet sich das Kaliumsalz krystallinisch aus. Dasselbe wird aus Wasser unter Alkoholzusatz zweimal umkrystallisiert. Es wurden 2,4 g analysenreines Salz erhalten.

0,5825 g lufttrockenes Salz verlieren bei 105°
0,0468 g H_2O, entspr. 8,03 Proz. H_2O.

Zu den übrigen Bestimmungen wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1506 g Substanz gaben 0,0629 g K_2SO_4, entspr. 18,76 Proz. K.
0,1974 g Substanz gaben 0,1239 g CO_2, „ 17,12 „ C
und 0,0553 g H_2O, „ 3,13 „ H.
0,1712 g Substanz gaben 10,00 ccm N (16,3°, 756,5 mm),
entspr. 6,77 Proz. N.
0,2150 g Substanz gaben nach v. Asboth
0,2402 g $BaSO_4$, entspr. 15,37 Proz. S.

Die wahrscheinliche Formel des Kaliumsalzes ist die:

$$\begin{array}{l} CH_2.SO_3H \\ | \\ CH.NH_2 \quad + H_2O. \\ | \\ COOK \end{array}$$

Berechnet für $C_3H_6NSO_5K + H_2O$	Gefunden
H_2O 8,00 Proz.	8,03 Proz.

Berechnet für $C_3H_6NSO_5K$	Gefunden
C 17,37 Proz.	17,12 Proz.
H 2,92 „	3,13 „
N 6,77 „	6,77 „
S 15,36 „	15,37 „
K 18,88 „	18,76 „

Baryumsalz.

2 g Cysteinsäure werden in 200 ccm Wasser gelöst und mit überschüssigem Baryumkarbonat eine halbe Stunde am Rückflufskühler gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert und das Filtrat mit viel 95 proz. Alkohol gefällt. Nachdem sich der erhaltene schneeweifse, voluminöse Niederschlag gut abgesetzt hat, wird er abgesaugt, mit verdünntem Alkohol ausgewaschen, auf Thon von Mutterlauge befreit und wiederholt mit Alkohol aus wässeriger Lösung umgefällt. Es wurden 2,6 g analysenreines Baryumsalz erhalten.

Zur Analyse wurde die Substanz im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet.

0,1479 g Substanz lieferten 0,0768 g $BaSO_4$, entspr. 30,53 Proz. Ba.
0,1651 g Substanz gaben 8,31 ccm N (19,3°, 771 mm),
entspr. 5,86 Proz. N.

Wie man sieht, ist dieses Salz identisch mit dem oben beschriebenen Baryumsalz, aber ebenso wenig wie früher stimmen die erhaltenen Zahlen für das Baryumsalz der Sulfosäure, trotzdem diesmal zur Darstellung des Salzes von analysenreiner Sulfosäure ausgegangen war. Wohl aber zeigen sie eine annähernde Übereinstimmung mit den für das Anhydrid der Sulfosäure verlangten Zahlen. Die Annahme, dafs dieses entstanden ist, scheint nicht willkürlich, da das erhaltene Baryumsalz alkalisch reagiert. Die wahrscheinliche Formel wäre also:

```
CH2 · SO3—Ba—O3S · CH2
|                 |
CHNH2             CHNH2
|                 |
CO———————O———————OC
```

Berechnet für $C_6H_{10}N_2S_2O_9Ba$	Gefunden I.	Gefunden II.
Ba 30,16 Proz.	30,79 Proz.	30,53 Proz.
N 6,16 „	6,47 „	5,86 „
S 14,07 „	13,90 „	—

(Die unter I aufgeführten Zahlen entsprechen den auf S. 26 angegebenen Analysen.)

Es sei jedoch nicht verschwiegen, dafs ich auch Baryumsalze in den Händen gehabt habe mit einem höheren Baryumgehalt. So wurde in einem Falle ein Baryumgehalt von 32,79 Proz. gefunden, in einem anderen Falle von 31,86 Proz., in einem dritten Falle von 31,79 Proz. Es gelang mir jedoch nicht, ausfindig zu machen, worauf diese Inkonstanz zurückzuführen ist.

Die Bestimmung der spezif. Drehung ergab, dafs das Baryumsalz schwach linksdrehend ist.

Zur Bestimmung gelangte ein aus der oben erwähnten zweiten Krystallisation der Sulfosäure dargestelltes Baryumsalz.

0,6219 g im Vakuum getrockneter Substanz wurden zu 15 ccm in Wasser gelöst und diese Lösung im 2 dcm-Rohr im Halbschattenapparat untersucht. Im Mittel von 5 Bestimmungen wurde ein Winkel von — 0° 41′ abgelesen.

Daraus berechnet sich

$$\alpha_{[D]} = -0{,}83^{\circ}.$$

Das Baryumsalz liefert bei der Spaltung im Rohr bei 240° neben geringen Mengen eines neutralen, stickstoff- und schwefelhaltigen Körpers Baryumsulfit.

Kupfersalz.

Trägt man in eine Lösung der freien Sulfosäure Kupferhydroxyd ein und kocht längere Zeit, bis kein Kupfer mehr aufgenommen wird, so erhält man ein tiefblaues Filtrat, dessen Blau einen schön violetten Ton zeigt, und das beim Einengen eine derbe Kruste von tiefblauen Krystallen absetzt. Dieselben werden aus viel Wasser wiederholt umkrystallisiert, bei 110° getrocknet und analysiert.

Die Substanz enthält kein bei 120° entweichendes Krystallwasser.

Zur Kupferbestimmung wurde die Substanz in salzsäurehaltigem Wasser gelöst; das Kupfer wurde als Kupfersulfür bestimmt.

0,2270 g Substanz gaben 0,0736 g Cu_2S, entspr. 25,89 Proz. Cu.
0,2212 g Substanz gaben 0,1192 g CO_2, „ 14,70 „ C
und 0,0593 g H_2O, „ 3,00 „ H.
0,1928 g Substanz gaben 9,99 ccm N (22,4°, 763 mm), entspr. 5,88 Proz. N.
0,1724 g Substanz gaben nach v. Asboth 0,1650 g $BaSO_4$, entspr. 13,14 Proz. S.

Diese Zahlen sprechen vielleicht für ein basisches Kupfersalz der Formel:

$$\begin{array}{l} CH_2.SO_3H \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOCuOH \end{array}$$

Berechnet für $C_3H_7NSO_6Cu$		Gefunden
Cu	25,57 Proz.	25,89 Proz.
C	14,47 „	14,70 „
H	2,83 „	3,00 „
N	5,65 „	5,88 „
S	12,89 „	13,14 „

Es wurde bereits erwähnt, daſs das Kupfersalz durch groſse Schwerlöslichkeit in kaltem Wasser ausgezeichnet ist. Jedoch fällt das einmal in viel heiſsem Wasser gelöste Salz beim Erkalten nicht wieder aus, und es ist hierzu erst Konzentration der wässerigen Lösung nötig.

Von der Schwerlöslichkeit wurde zur Reinigung der freien Sulfosäure Gebrauch gemacht, auch zur Isolierung der Cysteinsäure aus Gemengen kann diese Eigenschaft erfolgreich verwertet werden, da ich in den Fällen, wo ich bei der Oxydation mit Brom von nicht ganz reinem Cystin ausging und beim Einengen der Reaktionsflüssigkeit nur ölige, nicht krystallisierende Produkte erhielt, durch Darstellen dieses schwer löslichen Kupfersalzes mit Leichtigkeit zu reiner, schön krystallisierter Cysteinsäure gelangen konnte.

Zinksalz.

1 g Cysteinsäure wird mit einem Überschufs von Zinkkarbonat eine halbe Stunde gekocht. Nach dem Filtrieren wird das alkalisch reagierende Filtrat eingedampft. Es bleiben gut ausgebildete Drusen von Nadeln zurück. Sie werden in wenig heifsem Wasser gelöst, die Lösung heifs filtriert und in der Wärme mit Alkohol bis zur eben bleibenden Trübung versetzt. Der Alkoholzusatz mufs langsam geschehen, da das Produkt sonst leicht ölig ausfällt. Beim Erkalten krystallisieren nach längerem Stehen schön ausgebildete, stark glänzende, kurze Nadeln in drusenförmiger Anordnung aus.

Die Krystalle zeigen ausgesprochene Hemiedrie der Flächen. Eine einzelne Nadel unter dem Mikroskop betrachtet, zeigt an ihrem einen Ende eine rechtwinklig abgeschnittene Fläche, an dem anderen Ende zwei dachziegelförmig gegeneinander geneigte Flächen. Beim Aufbewahren über Schwefelsäure zeigen die Krystalle deutliche Verwitterungserscheinungen, sie verlieren ihren Glanz, werden opak und schrumpfen stark. Eine ähnliche, wenn auch nicht so starke Verwitterung zeigt die Substanz beim Aufbewahren an der Luft. Aus 1 g Cysteinsäure wurden 1,3 g analysenreines Zinksalz erhalten.

0,3227 g durch Alkohol, Äther getrockneter Substanz verloren bei Zimmertemperatur 0,0139 g H_2O, entspr. 4,34 Proz. H_2O.

0,3227 g durch Alkohol, Äther getrockneter Substanz verloren bei 110° 0,0570 g H_2O, entspr. 17,66 Proz. H_2O.

Das Zink wurde als basisches Zinkkarbonat bestimmt; nachdem die Substanz für diese Bestimmung und für die Elementaranalyse bei 110° getrocknet war.

0,1764 g Substanz gaben 0,0576 g ZnO, entspr. 26,24 Proz. Zn.
0,2086 g Substanz gaben 0,1122 g CO_2, „ 14,67 „ C
und 0,0537 g H_2O, „ 2,88 „ H.

Diese Analysen können für ein basisches Zinksalz der Formel:

$$\begin{array}{l} CH_2.SO_3H \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOZnOH \end{array}$$

mit 3 Mol. Krystallwasser gedeutet werden, von denen nahezu 1 Mol. bei Zimmertemperatur entweicht.

Berechnet für $C_3H_7NSO_6Zn + 3H_2O$	Gefunden
$3H_2O$ 17,74 Proz.	17,66 Proz.
$1H_2O$ 5,91 „	4,34 „

Berechnet für $C_3H_7NSO_5Zn$	Gefunden
Zn 26,10 Proz.	26,24 Proz.
C 14,37 „	14,67 „
H 2,82 „	2,88 „

B. Oxydation des Cysteins mit Brom.

Da sich bekanntlich Merkaptane und Disulfide bei der Oxydation verschieden verhalten, wurde auch das Verhalten des Cysteins gegen Brom untersucht. Um sicher zu sein, auch wirklich mit Cystein zu arbeiten, wurde die Base als Chlorhydrat der Oxydation unterworfen, da beobachtet wurde, dafs die freie Base je nach der Dauer des Aufbewahrens wieder mehr oder weniger vollständig in Cystin übergegangen war. Es ergab sich, dafs das Cystein dasselbe Oxydationsprodukt liefert wie das Cystin.

Die Oxydation mit Brom wurde in derselben Weise vorgenommen, wie sie beim Cystin beschrieben wurde, das Oxydationsprodukt nach Überführung in das Kupfersalz und Wiedergewinnung aus demselben durch wiederholtes Umkrystallisieren gereinigt.

Zur Analyse wurde die Substanz bei 110° getrocknet.

0,1710 g Substanz gaben 0,1338 g CO_2, entspr. 21,34 Proz. C
und 0,0696 g H_2O, „ 4,55 „ H.

0,1545 g Substanz gaben 11,59 ccm N (18,6°, 748 mm),
entspr. 8,50 Proz. N.

0,4333 g Substanz gaben nach v. Asboth 0,6153 g $BaSO_4$,
entspr. 19,50 Proz. S.

Berechnet für $C_3H_7NSO_5$		Gefunden
C	21,28 Proz.	21,34 Proz.
H	4,17 „	4,55 „
N	8,30 „	8,50 „
S	18,96 „	19,50 „

C. Überführung der Cysteinsäure in Taurin.

Wenn von den beiden für die Cysteinsäure möglichen Formeln die wahrscheinliche Formel

$$\begin{array}{l} CH_2.SO_3H \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

die richtige ist, so mufste eine einfache Kohlensäureabspaltung aus obiger Substanz zum Taurin führen

$$\begin{array}{l} CH_2.SO_3H \\ | \\ CH_2.NH_2. \end{array}$$

Versuche, diese Abspaltung unter dem Einflufs verdünnter Säuren im Rohr zu erzielen, fielen völlig negativ aus. Ich erhielt eine schmierige, schwärzliche Reaktionsflüssigkeit, aus der ich nur

nach langem, ziemlich mühseligem Arbeiten geringe Mengen eines stark sauer reagierenden Körpers isolieren konnte, dessen Elementaranalyse ihn als Cysteinsäure erkennen liefs, wenngleich seine Krystallform keiner der beiden beobachteten Krystallformen der Cysteinsäure entsprach. Vermutlich lag ein inaktives Produkt vor.

Bei Versuchen, die ich zu demselben Zweck mit dem Baryumsalz der Cysteinsäure anstellte, erhitzte ich dasselbe in wässeriger Lösung im Rohr, bekam aber nicht, wie ich erwartete, eine Baryumkarbonatausscheidung, sondern es war unter diesen Umständen mindestens die Hälfte des vorhandenen Schwefels als Baryumsulfit abgespalten worden. Beim Öffnen der Röhren entwich aber Kohlensäure unter Druck, wie einwandfrei nachgewiesen wurde, und es war deshalb möglich, dafs dementsprechend Taurin gebildet war. In der That gelang es mir auch, aus der Reaktionsflüssigkeit geringe Mengen eines neutralen stickstoff- und schwefelhaltigen Körpers zu isolieren, dessen Krystallform der dem Taurin zugeschriebenen entsprach, aber die Ausbeuten waren so spärliche, dafs es vieler Zersetzungsversuche bedurft hätte, um das zur Analyse nötige Material zu sammeln. Da ich nun ferner beobachtete, dafs die Baryumsulfitabscheidung im Rohr bereits bei verhältnismäfsig niedriger Temperatur begann, so schien es mir wahrscheinlich, dafs die Zersetzung des Baryumsalzes unter Druck in zwei Phasen verläuft, deren erste im wesentlichen eine Abspaltung von schwefliger Säure vorstellt, abhängig von dem Einflufs des Baryums und seiner vorhandenen Menge entsprechend, deren zweite aber in einer Kohlensäureabspaltung besteht, die aber nicht unter dem Einflufs des Baryums erfolgt sein konnte, da das meiste Baryum bereits entfernt war, sondern bei der die Wirkung des Wassers das wesentliche Agens sein mufste.

Diese Überlegung führte dazu, die Kohlensäureabspaltung aus der Cysteinsäure durch Erhitzen der freien Säure mit Wasser im Rohr bei erhöhter Temperatur zu versuchen.

2 g Cysteinsäure, die aus dem Kupfersalz gewonnen und vollkommen analysenrein waren, werden mit 15 ccm Wasser im Rohre erhitzt. Das Erhitzen wird so geleitet, dafs die Temperatur im Ofen innerhalb 2 Stunden auf 235° gebracht und darauf noch weitere 2 Stunden zwischen 235° und 240° gehalten wird. Nach völligem Erkalten wird die Röhre geöffnet, wobei unter beträchtlichem Druck ein geruchloses Gas entweicht, das als Kohlensäure erkannt wird. Die Reaktionsflüssigkeit ist ziemlich dunkel gefärbt und wird deshalb mit Tierkohle entfärbt. Ihre Reaktion ist nur schwach sauer, geringe Mengen abgespaltener Schwefelsäure sind nachweisbar. Nachdem auf ein kleines

Volumen eingeengt ist, findet beim Stehen eine reichliche, krystallinische Ausscheidung statt. Die derben, nadelförmigen Krystalle, die leicht grau schimmern, werden auf Thonplatten von der Mutterlauge getrennt, von neuem in Wasser gelöst und von wenig Tierkohle abfiltriert. Die Lösung reagiert jetzt gegen Lackmuspapier neutral. Aus der eingeengten Flüssigkeit schiefsen beim Erkalten lange Nadeln an, die deutlich einseitig abgestumpfte Ecken haben und somit die für das Taurin typische Krystallform besitzen. Durch wiederholtes Umkrystallisieren aus Wasser werden sie weiter gereinigt.

Man kann beobachten, dafs man unter Umständen Krystalle erhält, deren Lösung neutral reagiert, die aber, auf blaues Lackmuspapier gebracht und mit Wasser befeuchtet, einen deutlich roten Fleck hinterlassen. Man kommt in diesem Falle rasch zu einem analysenreinen Produkt, wenn man es aus Wasser umkrystallisiert, dem einige Tropfen stark verdünnten Ammoniaks zugesetzt sind.

Die Ausbeute aus 2 g Sulfosäure betrug 0,86 g analysenreines Produkt, was einer Ausbeute von 59 Proz. der theoretischen Menge entspricht. Die wirklich gebildete Taurinmenge ist jedoch gröfser, da bei dem Absaugen auf Thonplatten Verluste nicht zu vermeiden sind.

Der Versuch wurde unter Einhaltung der obigen Bedingungen dreimal mit positivem Erfolg wiederholt.

Die Analyse der bei 110° getrockneten Substanz bestätigte, dafs das erhaltene Produkt Taurin war.

0,1846 g Substanz gaben 0,1304 g CO_2, entspr. 19,27 Proz. C
und 0,0972 g H_2O, „ 5,89 „ H.

0,1544 g Substanz gaben 15,58 ccm N (23,7°, 756 mm),
entspr. 11,27 Proz. N.

0,1630 g Substanz gaben nach v. Asboth 0,3073 g $BaSO_4$,
entspr. 25,89 Proz. S.

Berechnet für $C_2H_7NSO_3$		Gefunden
C	19,18 Proz.	19,27 Proz.
H	5,64 „	5,89 „
N	11,22 „	11,27 „
S	25,62 „	25,89 „

Mit dem Nachweis des Taurins bei der Spaltung der Cysteinsäure ist für diese und ebenso für das Cystin bewiesen, dafs Thiogruppe und Aminogruppe an verschiedenen Kohlenstoffatomen stehen. Da die β-Stellung der Thiogruppe zur Karboxylgruppe durch den Nachweis der β-Thiomilchsäure festgestellt werden konnte, so ergiebt sich aus der Überführung der Cysteinsäure in Taurin die vermutete α-Stellung der Aminogruppe in der Cysteinsäure und daher auch im Cystin.

Die Formel des Cysteins ist demnach

$$\begin{array}{l} CH_2.SH \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH, \end{array}$$

die des Cystins

$$\begin{array}{lll} CH_2.S & \text{---} & S.CH_2 \\ | & & | \\ CH.NH_2 & & CH.NH_2 \\ | & & | \\ COOH & & COOH \end{array}$$

und die der Cysteinsäure

$$\begin{array}{l} CH_2.SO_3H \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH. \end{array}$$

D. Überführung der Cysteinsäure in Serin.

Bei der relativ leichten Abspaltung der Sulfogruppe aus der Cysteinsäure lag es nahe, zu versuchen, die Sulfogruppe durch die Hydroxylgruppe zu ersetzen. Es war zu erwarten, dafs dieser Weg zum Serin führen würde.

Die Vermutung, dafs Cystin und Serin in einem engen Zusammenhang stehen, ist so alt wie das Serin selber. Cramer*), der Entdecker des Serins, hat diese Hypothese bereits ausgesprochen, und da er für das Serin durch Überführung desselben in Glycerinsäure die Konstitution

$$\begin{array}{l} CH_2.OH \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH \end{array}$$

nachgewiesen hatte, war er geneigt, in dem Cystin (resp. in dem Cystein) ein Thioserin zu sehen. Jedoch brachte er keinerlei Beweise für diesen vermuteten Zusammenhang.

Nach ihm hat Baumann **) die Frage nach dem Zusammenhang dieser beiden Substanzen diskutiert, kam aber, da das Serin durch Barytwasser nur sehr allmählich und unvollständig unter Ammoniakentwickelung angegriffen wird und bei dieser Zersetzung weder Oxalsäure noch Uvitinsäure gebildet wird, zu dem Ergebnis, dafs

*) Jahresberichte 1865, S. 654; Zeitschr. f. prakt. Chem. **96**, 76.

) Ber. d. deutsch. chem. Ges. **15, 1735.

das Serin dem Cystin nicht analog gebaut ist. Er wurde gerade durch den von Cramer erbrachten Nachweis der Glycerinsäure bei der Behandlung des Serins mit salpetriger Säure in dieser Vorstellung bestärkt.

Neuerdings hat Kossel*) eine Vermutung über den Zusammenhang des Cystins und des Serins ausgesprochen. Kossel stellt für das Serin und das Cystein folgende Konstitutionsformeln auf:

$$\begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ C{<}^{OH}_{NH_2} \\ | \\ COOH \end{array} \qquad \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ C{<}^{SH}_{NH_2} \\ | \\ COOH \end{array}$$

Durch die vor kurzem von E. Fischer**) mitgeteilte Synthese des Serins durch Anlagerung von Ammoniak und Blausäure an Glykolaldehyd und Verseifung des entstandenen Produktes ist die Konstitution des Serins als α-Amino-β-oxypropionsäure zur Gewifsheit erhoben worden. Es besteht also zwischen Serin und Cystin sicherlich ein klarer chemischer Zusammenhang, der vielleicht nicht ohne biologische Bedeutung ist.

Eigene, ein halbes Jahr vor der Publikation von E. Fischer und H. Leuchs angestellte Versuche, die Überführung des Cystins in Serin auf dem Umwege der Cysteinsäure zu bewerkstelligen, haben zwar ergeben, dafs dieselbe möglich ist, doch bin ich nicht zu einer einfachen Methode gelangt, welche gestattete, das Serin konstant und in befriedigender Ausbeute zu gewinnen, doch mögen diese Versuche als die in der angedeuteten Richtung zuerst ausgeführten hier Erwähnung finden.

2 g Cysteinsäure werden in 400 ccm Barytwasser gelöst und im Autoklaven 8 Stunden bei 150° zersetzt. Nach dem Erkalten wird vom abgespaltenen Baryumsulfit abfiltriert, der gröfste Teil des überschüssigen Baryts durch Kohlensäure entfernt, der letzte Rest durch genaues Ausfällen mit verdünnter Schwefelsäure. Das zum dünnen Sirup eingeengte Filtrat setzt beim Stehen Drusen von Nadeln ab. Sirup und Krystalle werden in 80 proz. Alkohol gelöst, und die Lösung von einer geringen, amorphen Ausscheidung durch Filtration befreit. Beim Eindampfen der wässerig alkoholischen Lösung krystallisieren schöne Drusen von Nadeln aus, die mechanisch von der Mutterlauge getrennt und auf Thon abgesaugt werden. Durch weiteres Konzentrieren der Mutterlaugen können noch zwei Krystallisationen erhalten werden, die wie

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 34, 3220.

**) Emil Fischer und Hermann Leuchs, Sitzungsber. d. königl. preufsischen Akademie der Wissenschaften zu Berlin; Sitzung d. phys.-math. Klasse v. 30. Januar 1902.



die erste behandelt werden. Die gut abgepreſsten Krystalle werden in Wasser gelöst, mit Kupferhydroxyd gekocht und die filtrierten, prachtvoll blauvioletten Lösungen stark eingeengt, der Rückstand wird mit 75 proz. Alkohol aufgenommen und dieser Auszug von neuem eingedampft. Der so erhaltene Rückstand, mit verdünntem Alkohol aufgenommen, giebt eine Lösung, die beim starken Konzentrieren schön blauviolett gefärbte, blättchenförmige Krystalle liefert, die Stickstoff enthalten, aber frei von Baryum und Schwefel sind.

Bei der ersten Darstellung wurden aus 2 g Cysteinsäure 0,32 g Kupfersalz erhalten, bei der zweiten 0,08 g. Es konnte nur der Kupfergehalt der bei 110° getrockneten Substanz bestimmt werden.

0,2570 g Substanz gaben 0,0866 g CuO, entspr. 23,80 Proz. Cu.
0,0774 g „ „ 0.0232 g CuO, „ 23,94 „ Cu.

Berechnet für $C_6H_{12}N_2O_6Cu$	Gefunden I.	Gefunden II.
Cu 23,40 Proz.	23,80 Proz.	23,94 Proz.

Versuche, durch kürzere Baryteinwirkung bei 170° und bei 200° bessere Ausbeute zu erhalten, fielen negativ aus. Vielleicht gelingt es aber, durch Arbeiten mit berechneten Mengen Baryt bei einer Temperatur unterhalb 150° zum Ziele zu gelangen.

Schluſsbetrachtung.

Mit dem Nachweis, daſs das Cystin eine α-Diamino-β-dithiodilaktylsäure ist, wird der von Baumann vertretenen Anschauung eines direkten chemischen Zusammenhanges der Merkaptursäuren und des Cystins der experimentelle Boden entzogen, da die den beiden Körpern entsprechenden Cysteine verschieden gebaut sind. Das den Merkaptursäuren zu Grunde liegende Cystein mag, wegen der α-Stellung seiner Thiogruppe, als α-Cystein bezeichnet werden, woraus sich für das Cystein, dessen Disulfid das Cystin ist, die Benennung als β-Cystein ergiebt:

```
      CH3               CH2.SH
      |                 |
NH2.C.SH               CH.NH2
      |                 |
      COOH              COOH
  α-Cystein.          β-Cystein.
```

Beides sind, wie ein Blick auf obige Formeln zeigt, zwar isomere, aber doch ganz verschiedene Substanzen, und die beobachteten Abweichungen in dem chemischen Verhalten ihrer Derivate voneinander finden hierin eine ausreichende Erklärung.

Das α-Cystein erweist sich, wie die obige Formel zeigt, als Brenztraubensäureabkömmling, und seine Derivate geben daher bei der Alkalispaltung mit Leichtigkeit Brenztraubensäure, während das β-Cystein ein Glycerinsäurederivat ist. Letzteres kann daher auch bei der Alkalispaltung nicht direkt Brenztraubensäure liefern, was durch zahlreiche Versuche bestätigt wird. Sollte diese Säure aber dennoch bei andauernder Einwirkung von Alkali auf das Cystin entstehen, so ist ihre Bildung als ein sekundärer Prozefs aufzufassen, da Übergänge von Glycerinsäure in Brenztraubensäure unter verschiedenen Bedingungen beobachtet worden sind*). Damit würde das Auftreten von Oxalsäure und Uvitinsäure unter den Spaltungsprodukten des Cystins eine Erklärung finden, ohne auf die von Baumann konstruierte Analogie im Bau der Merkaptursäuren und des Cystins zurückgreifen zu müssen. Die Verschiedenheiten im chemischen Verhalten der Derivate des α-Cysteins und des β-Cysteins beschränken sich aber nicht blofs auf das Auftreten resp. auf das Ausbleiben der Brenztraubensäure unter den Produkten intensiver Alkalieinwirkung, sondern es liegen noch einige andere Beobachtungen über abweichendes Verhalten der beiden Substanzen gegen Alkali vor, die, nachdem die verschiedene Struktur des Cystins und der Merkaptursäuren bewiesen ist, erneute Beachtung beanspruchen.

Baumann und Goldmann**) haben gezeigt, dafs das Cystin seinen Schwefel auch bei längerem Erhitzen mit Alkalien nicht vollständig abgiebt, während die Merkaptursäuren bei gleicher Behandlung ihren Schwefel nahezu quantitativ als Merkaptan abspalten.

Als Brenzinger***) Äthylcystein (Äthyl-β-cystein) mit Fehlingscher Lösung gerade auf die Temperatur erhitzte, bei der überhaupt Spaltung eintritt (70° bis 75°), so trat die Ammoniakentwickelung erst auf, als die Abscheidung des Kupfermerkaptids nahezu beendet war, während beim Phenylcystein (Phenyl-α-cystein) nach den Beobachtungen von Baumann und Preufse†) stets gleichzeitig Ammoniak und Phenylmerkaptan abgespalten wird. Auch dieses Verhalten wird beim Betrachten der entsprechenden Formeln leicht verständlich:

---

*) Moldenhauer, Ann. 131, 323; Erlenmeyer, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 14, 321.

**) Zeitschr. f. physiol. Chemie 12, 261 (1888).

***) Ebenda 16, 570 (1892).

†) Ebenda, l. c.

$$\begin{array}{c} CH_2.S.C_2H_5 \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH \end{array} \qquad \begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ NH_2.C.S.C_6H_5 \\ | \\ COOH \end{array}$$

Äthyl-β-cystein. Phenyl-α-cystein.

Auch nach der physiologischen Seite ist an einem direkten Zusammenhang zwischen Merkaptursäuren und Cystin in dem Sinne, dafs die Merkaptursäurebildung im tierischen Organismus eine experimentelle Cystinurie sei, nicht mehr festzuhalten, vielmehr kann man sich dem Schlusse nicht entziehen, dafs der tierische Organismus eben über zwei Cysteine verfügt, das α-Cystein der Merkaptursäuren und das β-Cystein der Eiweifskörper.

Wenn so einerseits eine klare und einfache physiologische Vorstellung durch vorstehende Untersuchung zerstört wird, wird auf der anderen Seite eine Grundlage gegeben, nach welcher Richtung die Bedeutung des Cystins im normalen tierischen Stoffwechsel zu suchen ist. Denn da gezeigt werden konnte, dafs das Cystin leicht und glatt in Taurin übergeführt werden kann, hat die Vermutung eine hohe Wahrscheinlichkeit, dafs auch für den tierischen Organismus das Cystin die Quelle darstellt, aus dem er das bei der Ausscheidung der Taurocholsäure verwendete Taurin bildet. Damit ist aber auch für das Taurin seine Abstammung vom Eiweifs gegeben, eine Beziehung, die die Fütterungsversuche von Kunkel*) und P. Spiro**) nur vermuten liefsen. Denn diese Forscher konnten an Gallenfistelhunden zeigen, dafs, wenn man das den Hunden zugeführte Eiweifs auf die achtfache Menge steigerte, die Stickstoff- und Schwefelausscheidung durch die Galle der Versuchstiere auf das Doppelte anstieg.

Aber für diese Vermutung ist ebenso noch der Beweis durch das Tierexperiment zu erbringen, wie für die andere damit eng verbundene Frage nach der Art, wie diese Überführung im tierischen Organismus erfolgt. Ist hierzu die Bildung der Cysteinsäure nötig, und erfolgt dann die Taurinbildung durch fermentative Kohlensäureabspaltung ***), oder bildet der Organismus das Taurin direkt durch Oxydation der Thiogruppe zur Sulfogruppe unter gleichzeitiger Abspaltung der endstelligen Karboxylgruppe in ein und demselben Prozefs? Diese Fragen scheinen ebenfalls dem Tier-

*) Pflügers Archiv 14, 344.
**) Du Bois' Archiv, 1880, Suppl.-Band, S. 50.
***) R. L. Emerson, Diese Beiträge I, S. 502 (1901).

experiment zugänglich zu sein und laden zu weiterer Forschung in der angegebenen Richtung ein.

Auch der nachgewiesene Zusammenhang des Cysteins und des Serins bietet vielleicht ein biologisches Interesse und giebt zu der Vermutung Anlafs, dafs diejenigen Eiweifsstoffe, die keinen locker gebundenen Schwefel, also auch kein Cystin aufweisen, Serin enthalten, dafs Cystein und Serin einander je nach Bedarf des pflanzlichen oder tierischen Organismus ersetzen können, eine Vermutung, die bei der grofsen chemischen Ähnlichkeit der Thio- und der Hydroxylgruppe einige Wahrscheinlichkeit hat. Nach der chemischen Seite läfst dieser Zusammenhang daran denken, einen Aufbau des Cysteins von dem bereits synthetisch erhaltenen Serin aus mit Hülfe eines Ersatzes der Hydroxylgruppe durch die Thiogruppe zu versuchen.

II.

Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweifsbildung der Schimmelpilze.

Von F. Czapek.

(Ausgeführt mit Unterstützung der Gesellschaft zur Förderung deutscher Wissenschaft, Kunst und Litteratur in Böhmen.)

3. Die Verarbeitung von Nitro- und Hydrazinderivaten und von aromatischen Stickstoffverbindungen. — Schlufsbetrachtungen.

Nachdem wir die Stoffe, welche bei Aspergillus niger als wichtigstes Substrat für die Aminosäuren- und Eiweifssynthese dienen können, in der zweiten Studie dieser Reihe kennen gelernt haben, erübrigt es noch, eine Reihe abweichend gebauter Stickstoffverbindungen auf ihren Nährwert als Stickstoffquelle hin zu prüfen. Hierbei ergab sich eine Anzahl erwähnenswerter Thatsachen von gröfserer oder beschränkterer Bedeutung, über die ich noch berichten will.

a) Versuche mit anorganischen und organischen Nitroderivaten.

Es ist eine bekannte Thatsache, dafs sich die Pflanzen gegen Nitrate sehr verschieden verhalten. Man weifs schon lange, dafs Saccharomyceten bei Darreichung von Nitraten ihren Stickstoffbedarf nicht zu decken vermögen; sie können demnach daraus die NH_2-Gruppe nicht herstellen. Hingegen ist augenscheinlich Salpetersäure, also das Ion NO_3, für Phanerogamen eine der allerbesten Stickstoffquellen, ebenso für Algen. Bei der Hefe ist die Untüchtigkeit der Nitrate um so auffallender, als der Pilz anstandslos Sulfate zu SH_2-Derivaten zu reduzieren vermag.

Tabelle I.

Substanz	Stickstoffgehalt derselben Proz.	Pilztrockengewicht auf 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zucker mg
Ammonnitrat	35,05	213,2
Kaliumnitrat	13,87	157,6
Nitromethan $CH_3 - NO_2$	22,99	14,9
Methylhydrazin $NH_2 - NH - CH_3$ (Sulfat mit NaOH abgestumpft)	19,47	148,1
Phenylhydrazin $NH_2 - NH - C_6H_5$ (Chlorhydrat)	—	—
Äthaldoxim $N \genfrac{}{}{0pt}{}{\diagup\!\!\diagup CH - CH_3}{\diagdown OH}$	—	—
Acetoxim $C \genfrac{}{}{0pt}{}{\diagup CH_3}{\diagdown CH_3} = N - OH$	—	—

Aspergillus niger wächst wie andere Schimmelpilze auf Nitraten ganz gut, wenn er auch augenscheinlich Ammoniumsalze bevorzugt. Dies zeigt sich auch darin, dafs er auf Ammonnitrat besser gedeiht als auf Kalisalpeter. Die NO_2-Gruppe wird also jedenfalls in die Amidgruppe durch Aspergillus nicht schwer übergeführt. Hervorzuheben ist, was ich bisher nicht angegeben fand, dafs der Pilz auch Nitromethan verarbeitet. Er bildet wohl darin nur eine schwache konidienarme Vegetation, doch findet Wachstum statt (vgl. die Zahlenwerte in Tabelle I).

Über den Reduktionsvorgang, der sich an der Nitrogruppe abspielt, läfst sich in keinem Falle etwas Bestimmtes aussagen. NH_4-Ionen brauchen nicht das Endprodukt zu sein, es können auch komplexe NH_2- oder NHhaltige Gruppen entstehen, die das Material zur Aminosäuresynthese abgeben. Für die Nitroparaffine hat V. Meyer gezeigt, dafs ihre Reduktion zu Alkylaminen über das Zwischenstadium von Alkylhydroxylamin führt. Analoge Vorgänge sind bei der Verarbeitung von Nitromethan durch Aspergillus nicht ausgeschlossen, obwohl verschiedene Untersuchungen die toxischen Eigenschaften von Hydroxylamin feststellen konnten. Minimale Mengen dieses Zwischenproduktes könnten dennoch vor-

Stick-stoffausnutzung 100	Aussehen der Kultur	Pilztrockengewicht auf 4proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoffausnutzung 100:	Aussehen der Kultur
14,6	Schöne konidienreiche Decke	—	—	—
27,3	Schöne konidienreiche Decke	—	—	—
1,5	Schwache schleimige konidienarme Vegetation	—	—	—
18,2	Gekröseartige weifse konidienlose Vegetation	—	—	—
—	kein Wachstum	—	—	—
—	kein Wachstum	—	—	—
—	kein Wachstum	—	—	kein Wachstum

übergehend auftreten. Übrigens würde gerade durch die Bildung solcher toxischer Zwischenprodukte die relativ schlechte Wirkung von Nitromethan erklärt werden; man hat natürlich auch zu berücksichtigen, dafs der Vorgang durch verschieden leichte Verarbeitung des Paarlings der NO_2-Gruppe beeinflufst werden kann.

b) Versuche mit Hydrazinen.

Abgesehen von der Feststellung der Giftwirkung des Diamids durch O. Loew sind mir auf diesem Gebiete keine Angaben bekannt geworden. Nach meinen Erfahrungen giebt es unter den Alkylhydrazinen thatsächlich Stoffe, die relativ gute Stickstoffquellen sind. So steht das Methylhydrazinsulfat an Wirkung vielen Stoffen mit der NH_2-Gruppe nicht nach (Tabelle I). Konidienbildung beobachtete ich auf diesem Substrate allerdings nicht, die Decke war weifs, von abnormem Aussehen. Phenylhydrazin war untauglich. Jedenfalls erfährt man aus den Versuchen, dafs die Gruppe $-NH-NH_2$ als Stickstoffquelle benutzt werden kann und negative Resultate durch das Alkyl hervorgerufen werden. Aminosäuresynthese findet jedoch gewifs nur schwierig statt.

Tabelle II.

Substanz	Stickstoffgehalt der Substanz Proz.	Pilztrockengewicht auf 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zucker mg
o-Aminophenol (OH, NH_2 ortho)	12,87	116,0
p-Aminophenol (OH, NH_2 para)	"	247,5
m-Aminophenol Chlorhydrat (OH, NH_2 meta)	"	—
o-Aminobenzaldehyd (COH, NH_2 ortho)	—	In konz. Lösung
Aminoacetophenon ($CO-CH_3$, NH_2)	—	—
Diaminophenol, Amidol Chlorhydrat (OH, NH_2, NH_2)	14,24	241,9
Diaminoresorcin, Chlorhydrat	—	—
Benzoylanilid $NH<^{CO-C_6H_5}_{C_6H_5}$	7,12	37,3
Isatin $C_6H_4<^{CO}_{NH}>CO$	—	—
Nikotinsäure (Natronsalz) (COOH, N)	9,676	103,6
Pyridin und Chinolin (Chlorhydrat)	—	—
Rhodannatrium $NaS-CN$	17,3	87,9
Ferrocyankalium $Fe<^{(CN)_3K_2}_{(CN)_3K_2}$	—	—
Ferricyankalium $Fe<^{(CN)_3K}_{(CN)_3K_2}$	—	—
Nitroprussidnatrium $Fe(CN)_5(NO)Na_2$	—	—

Stickstoff-ausnutzung 100:	Aussehen der Kultur
21,6	Wenige gröſsere konidienarme Rasen
46,1	Dünne schwarze Decke
—	Sehr schwache Vegetation
3 Proz. Zucker	Dünner Rasen. Nicht gewogen.
—	Kein Wachstum
40,7	Dünne schwarze Decke
—	Kein Wachstum
12,55	Dünne schleimige konidienarme Decke
—	Je ein 1 cm im Durchmesser haltendes, konidientragendes Räschen ausgebildet
25,7	Gute schwarz und weiſs gescheckte Decke
—	Kein Wachstum
12,2	Weiſse zusammenhängende Decke
—	Kein Wachstum
—	Sehr kleine weiſse Mycelflöckchen. Nicht gewogen.
—	Sehr dünne Decke oder Räschen. Von Wägung abgesehen.

Tabelle III

Ammonsalz der	Molekulare Leitfähigkeit v = 2048 Lit.	Stickstoffgehalt der Substanz Proz.	Pilztrockengewicht auf 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zuck. mg
Benzoesäure (C_6H_5–$COONH_4$)	24,6	—	—
o-Toluylsäure (C_6H_4($COONH_4$)(CH_3))	—	—	—
Hydrozimtsäure (C_6H_5–CH_2–CH_2–$COONH_4$)	15,71	8,4	10,4
Zimtsäure (C_6H_5–CH=CH–$COONH_4$)	19,18	8,5	423,4
Phenoxylessigsäure (C_6H_5–O–CH_2–$COONH_4$)	56,55	8,3	9,5
Salicylsäure (C_6H_4($COONH_4$)(OH))	59,88	9,05	675,7
m-Oxybenzoesäure (C_6H_4($COONH_4$)(OH))	26,82	"	123,3
p-Oxybenzoesäure (C_6H_4($COONH_4$)(OH))	17,19	"	169,9
Gallussäure (C_6H_2($COONH_4$)(OH)(OH)(OH))	—	7,087	547,3

Stickstoffausnutzung 100:	Aussehen der Kultur	Pilztrockengewicht auf 4 proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoffausnutzung 100:	Aussehen der Kultur
—	Kein Wachstum	—	—	—
—	Kein Wachstum	—	—	—
2,9	Sehr spärliche helle Rasen	—	—	—
100,0	Knollige Rasen	—	—	—
2,7	Viele sehr kleine weifse Räschen	—	—	—
100,0	Knollige dicke dunkelbraune Rasen	—	—	Kein Wachstum
32,7	Schöne Decke	—	—	—
45,0	Schöne schwarz und weifs gescheckte Decke	210,1	13,9	Dicke konidienarme Schollen
100,0	Schöne schwarze Decke	249,8	21,1	Schöne Decke

Tabelle III

Ammonsalze der	Molekulare Leitfähigkeit v = 2048 Lit.	Stickstoffgehalt der Substanz Proz.	Pilztrockengewicht auf 1 proz. Lösung + 3 Proz. Zuck. mg
Phtalsäure $C_6H_4(COONH_4)_2$	63,39	14,03	123,4
Phtalimid (K) $C_6H_4(CO)_2NH$	—	7,58	55,1
Mellithsaures Ammon $C_6(COONH_4)_6$ . . .	—	13,88	405,1
Chinasaures Ammon $C_6H_2(HOH)_4(COONH_4)$ . . .	42,27	6,71	187,2

c) Versuche mit Oximen.

Dafs der Stickstoff in Derivaten des Hydroxylamins nicht ausgenutzt werden kann, war aus chemischen Gründen fast zu erwarten; in der That ist z. B. Äthaldoxim $OH - N = CH - CH_3$ und Acetoxim $OH - N = C(CH_3)_2$ für Aspergillus als Stickstoffquelle nicht brauchbar. Der Pilz ist nicht im stande, aus diesen Stoffen etwa Nitril oder Säureamid zu bilden.

d) Versuche mit cyklischen Stickstoffverbindungen.

Obwohl in früheren Versuchsreihen Benzolderivate mit berücksichtigt worden sind, so erübrigt doch noch, ausführlicher auf die stickstoffhaltigen aromatischen Stoffe in ihrer Bedeutung als Stickstoffquelle für Aspergillus zurückzukommen, zumal einige Momente, welche für die Bedeutung der Aminosäuren von Wichtigkeit sind, hier gut hervortreten.

Wenden wir uns zunächst jenen Stoffen zu, welche Amino-

'ortsetzung).

Stick-toffaus-utzung 100:	Aussehen der Kultur	Pilztrockengewicht auf 4 proz. Lösung ohne Zucker	Stickstoffausnutzung 100:	Aussehen der Kultur
21,1	Schwache schwarze Decke	—	—	—
17,4	Schwächl. schwarze Decke	—	—	—
70,0	Gute schwarze Decke	Keimung, aber kein Wachstum		
66,9	Schöne schwarze Decke	340,8	30,4	Schöne Decke

derivate des Benzols im engeren Sinne darstellen und eine bis mehrere $—NH_2$-Gruppen direkt an ein C-Atom des Ringes angelagert enthalten. Dafs das Anilin, als Stammsubstanz dieser Derivate, keine schlechte Stickstoffnahrung abgiebt, wissen wir bereits von früher; es sei auch daran erinnert, dafs die Toluidine und Xylidine sämtlich unwirksam waren. Die Versuchsergebnisse, die Tabelle II aufweist, zeigen weiter, dafs die Aminophenole sämtlich Stickstoffquellen darstellen können; am besten brauchbar war p-Aminophenol und o-Aminophenol, am schlechtesten m-Aminophenol.

Ebensogut wie p-Aminophenol nährt (2,4) Diaminophenol, das Amidol des Handels. Es sei daran erinnert, dafs auch unter den Phenylendiaminen sich im m-Phenylendiamin ein, freilich nur sehr mäfsiger, Nährstoff fand.

Alle diese Stoffe sind, wenn überhaupt wirksam, nur dann Nährsubstanzen, wenn gleichzeitig Zucker als Kohlenstoffquelle dargereicht wird; sonst unterhalten sie das Pilzwachstum gar nicht. Unter den aromatischen Aminoderivaten mit kohlenstoffhaltiger Seitenkette erwies sich zunächst der o-Aminobenzaldehyd, in konzentrierter Lösung mit 3 Proz. Zucker dargereicht, nur als schlechte Stickstoffquelle; o-Aminoacetophenon rief gar kein Wachstum hervor.

An diese Substanzen schliefsen sich nun die aromatischen Aminosäuren an; es war von Interesse, diese Stoffe mit den aliphatischen Aminosäuren zu vergleichen. Sowohl Ortho- als Paraaminobenzoesäure sind, als Natronsalz dargereicht, keine Kohlenstoffquelle. Nur auf metaaminobezoesaurem Natron wurde eine spurenweise Vegetation in Form kleiner weifslicher Räschen (10,2 mg Erntegewicht) erzeugt. Mit gleichzeitiger Zuckerdarreichung sind aber alle drei Säuren als Stickstoffquelle verwendbar. Am besten nährte Metaaminobenzoesäure (80,5 mg Ernte), dann folgte die Paraverbindung (28,4 mg Ernte), am schlechtesten bewährte sich die Anthranilsäure (7 mg Ernte). Die Stickstoffausnutzung erfolgte bei den 3 Säuren in der Reihenfolge 100:21,9; :7,7; :1,9. Es ist unzweifelhaft der Nährwert dieser Aminosäuren ein unverhältnismäfsig geringer gegenüber den aliphatischen α-Aminosäuren. Zur Erklärung dieses differenten Verhaltens liegt es nahe, die Ursache in der Anfügung der $-NH_2$-Gruppe zu suchen. Offenbar ist es die Gruppe $-CH_2NH_2$ in Bindung mit der Karboxylgruppe

$$\begin{array}{l} CH_2NH_3, \\ | \quad / \\ COO \end{array}$$

welche die biochemische Bedeutung der α-Aminosäuren bedingt. Da nun auch die aromatischen α-Aminosäuren als cyklische Ammonsalze aufgefasst werden können, kann die Differenz nur im Vorhandensein und Nichtvorhandensein der Gruppe

$$\begin{array}{c} H \\ | \\ -CHNH_2 \end{array}$$

begründet sein. Eine gute Bestätigung erfährt diese Ansicht durch die bedeutende Überlegenheit des Benzylamins über das Anilin als Stickstoffnahrung.

Benzylamin: $C_6H_5CH_2NH_2$ (Benzolring mit CH_2NH_2) Anilin: $C_6H_5NH_2$ (Benzolring mit NH_2)

Benzoylanilid mit der Struktur $C_6H_5-NH-CO-C_6H_5$ kann ebenfalls aus den angeführten Gründen keine bessere Stickstoffquelle darstellen.

Einige bemerkenswerte Thatsachen treten uns ferner bei den Ammonsalzen der aromatischen Säuren entgegen. Von allen unter-

suchten Substanzen sind nur wenige gute Kohlenstoffquellen. Die allerbeste Kohlenstoffnahrung bieten die hydrierten Benzolderivate.

Der hohe Nährwert der Chinasäure war schon Nägeli aufgefallen. In der That ist dieselbe ein weit besserer Nährstoff als alle anderen von mir untersuchten hydroxylierten Kohlenstoffverbindungen, mit Ausnahme der Hexosen. Sie muſs besonders leicht zur Zuckersynthese durch Ringsprengung verwendet werden können. Ebenso leicht gelingt dies aber auch mit anderen hydroaromatischen Derivaten, z. B. mit Quercit und Inosit. Diese biochemischen Thatsachen können ihre Verwertung zur Bestätigung der Ansicht finden, daſs die Benzolderivate im Pflanzenorganismus groſsenteils aus hydroaromatischen Verbindungen hervorgehen, deren Entstehung aus Zucker leicht möglich ist.

Bei den aromatischen Derivaten steigt der Wert als Kohlenstoffquelle mit der Hydroxylzahl. Polyphenole, wie Gallussäure, sind ganz gute Kohlenstoffquellen. Wahrscheinlich ist es hier leichter möglich, eine Hydrierung und Ringsprengung vorzunehmen. Auffällig ist nur der relative hohe Nährwert der Paraoxybenzoesäure*) als Kohlenstoffquelle.

Die übrigen Stoffe waren keine guten Kohlenstoffquellen.

Als Stickstoffnahrung neben Zucker dargereicht sind jedoch eine ganze Reihe von Ammonsalzen der aromatischen Säuren gut verwendbar. Die Eignung scheint hier nicht durch die elektrolytische Dissoziation oder Affinitätskonstante der Säure als einem Hauptfaktor beeinfluſst zu werden. Es sind stark dissoziierte Säuren, wie Phtalsäure, in Form ihrer Ammonsalze wenig wirksam, während schwächer dissoziierte Säuren, wie Zimtsäure, ganz gut wirken. Es wird die sonst günstige Wirkung der starken elektrolytischen Dissoziation in manchen Fällen wahrscheinlich durch anderweitige schädliche Wirkung des Säurerestes fast aufgehoben. Benzoesäure selbst war unwirksam. Die Ammonsalze ihrer drei Oxysäuren sind sämtlich gute Stickstoffquellen, die beste aber das Salicylat, vielleicht im Zusammenhange mit der starken Dissoziation der Orthooxybenzoesäure.

Bemerkenswert ist ferner, daſs Zimtsäure und Hydrozimtsäure, die ungefähr gleich starke Säuren sind, im Nährwerte stark verschieden sind. Die stark dissoziierte Phenoxylessigsäure war schlecht geeignet, ebenso Phtalsäure und ihr Imid nur mittel-

*) Über Wirkung der p-Oxy- und p-Aminobenzoesäure auf Phanerogamen haben unlängst A. Benedicenti und G. B. de Toni berichtet (Giornale della reale Ac. di Medicina de Torino 1901).

mäfsig. Mellithsaures Ammon hingegen ist als sehr gute Stickstoffquelle anzusehen.

Heterocyklische Stickstoffverbindungen scheinen nur selten zur Stickstoffversorgung geeignet zu sein, wie die vielen Angaben über Ernährung mit Alkaloiden u. s. w. zeigen. Ich fand Pyridin und Chinolin selbst (als Chlorhydrat) dargereicht ungeeignet. Der Pyridinring selbst scheint jedoch von Aspergillus unschwer gesprengt zu werden. Darauf läfst der günstige Effekt von nikotinsaurem Natron schliefsen, auf dem Aspergillus ganz normal aussehende Pilzdecken produziert. Wahrscheinlich ist das Pyridin selbst aus anderweitigen Gründen ungeeignet. Bei der Sprengung des Pyridinringes ist wohl auch als vorausgehendes Stadium Hydrierung zu Piperidin anzunehmen, aus dem eventuell Amine oder Diamine entstehen.

Der Pyrrolring im Isatin ist dem Aspergillus gleichfalls nicht unzugänglich, und es werden sich wohl Pyrrolderivate finden, die noch besser wirken. Indolderivate dürften wohl insgesamt schlechtere Nährstoffe darstellen*).

e) Cyan- und Sulfocyanverbindungen.

Hier ist von Interesse der nicht ganz geringe Nährwert des Rhodannatriums. Konidienbildung beobachtete ich bei diesen Versuchen aber nicht.

Nitroprussidnatrium und Ferricyankalium nährten nur sehr wenig. Ferrocyankalium wurde gar nicht assimiliert.

Bemerkungen über die Art der Beteiligung der Aminosäuren an der Eiweifssynthese.

Auf Grund der durch das beigebrachte Thatsachenmaterial erworbenen Erkenntnis, dafs Aminosäuren als Intermediärstadium bei der Eiweifssynthese gebildet werden, will ich schliefslich noch versuchen, ihre Bedeutung hierbei von einigen Seiten her näher zu präzisieren.

Die erste Arbeit dieser Reihe hat gezeigt, dafs alle aliphatischen α-Aminosäuren für Aspergillus ideale Stickstoffquellen sind, und dafs der dargereichte Aminosäurestickstoff nach drei bis vier Wochen fast vollständig in der Pilzernte wiedergefunden wird, die Nähr-

*) Für die Verarbeitung von Pyrrolderivaten bietet ferner Interesse die in allerjüngster Zeit von O. Emmerling, Ber. chem. Ges. 35, 2289 (1902) publizierte Beobachtung, dafs die α-Pyrrolidinkarbonsäure für die meisten Schimmelpilze eine gute Stickstoffquelle darstellt.

lösung demnach bei dem obwaltenden Verhältnisse: ein Prozent Aminosäure und drei Prozent Rohrzucker, gänzlich erschöpft ist. Selbst das Taurin mit der Struktur einer Sulfosäure $\begin{array}{l} CH_2NH_2 \\ | \\ CH_2 . SO_3H \end{array}$ wird vollständig assimiliert. Die Derivate der Aminosäuren sind oft ebenso gute Stickstoffquellen: z. B. Trimethylaminoessigsäure, Benzoylaminoessigsäure. Hingegen steht das der Aminopropionsäure isomere Sarkosin (Methylaminoessigsäure) der ersteren Säure beträchtlich nach, ebenso die phenylierten Alaninderivate, Phenylalanin und Tyrosin.

Sehr wichtig ist nun die Erfahrung, dafs die hohe Eignung der Aminosäuren als Stickstoffquelle in hohem Grade unabhängig ist von dem Werte der betreffenden Aminosäure als Kohlenstoffnahrung. Schlechte Kohlenstoffquellen, wie Asparagin, Glykokoll, Phenylalanin, auf denen ohne gleichzeitige Zuckerdarreichung nur Pilzernten von höchstens gegen 30 mg erzielt werden, wirken bei gleichzeitiger Zuckerzufuhr als ebenso gute Stickstoffquelle, wie Aminopropionsäure oder Hippursäure, welche bis zu 200 mg Pilzernte ohne Zucker erzielen lassen. Die Bedeutung der Aminosäuren ist daher in ihrer stickstoffhaltigen Gruppe, eventl. in ihrer Natur als cyklisches Ammonsalz zu suchen. Sie sind nur sehr wenig ionisiert, und ihre elektrolytische Dissoziation kann biochemisch keine erhebliche Rolle spielen.

Es wurde schon früher gezeigt, dafs die Gruppe $\overset{|}{C}H_2NH_2$ das wirksame Agens bei der Funktion der Aminosäuren darzustellen scheint. Die geringen Nährerfolge der aromatischen Aminosäuren mit der Konstitution $\begin{array}{l} =C\diagdown \\ \quad C-NH_2 \\ \quad /\!/ \\ -C \end{array}$ beweisen dies ebenso, wie das Verhältnis der Nährwerte von Anilin $C_6H_5-NH_2$ $\left(\begin{array}{l} =C\diagdown \\ \quad C.NH_2 \\ \quad /\!/ \\ -C \end{array}\right)$ und Benzylamin $\left(\begin{array}{l} =C\diagdown \\ \quad C-CH_2NH_2 \\ \quad /\!/ \\ -C \end{array}\right)$, von denen das letztere bedeutend besser verwendbar ist.

Weiter erwies sich von Bedeutung für die Eignung als Stickstoffquelle, dafs die $-CH_2NH_2$-Gruppe noch mit mindestens einem

C-Atom, besser noch mit mehreren in Verbindung steht. So war das Äthylamin deutlich geeigneter als Methylamin. Auch dieser Umstand mag bei der günstigen Wirkung der in α-Aminosäuren vorhandenen Gruppe $\begin{matrix}-CHNH_2\\ |\\ COOH\end{matrix}$ eine gewisse Rolle spielen. Hingegen kommt dem Charakter der Aminosäuren als cyklische Ammonsalze: $\begin{matrix}-CHNH_3\\ |\quad|\\ COO\end{matrix}$ wahrscheinlich keine entscheidende biochemische Bedeutung zu, weil es Stoffe giebt, welche, wie die aromatischen Aminosäuren, diesen Charakter besitzen, ohne hervorragende Nährfähigkeit aufzuweisen.

Wenn wir uns diese Einzelheiten, die sich bei der Untersuchung der Aminosäuren als Nährmaterial ergeben haben, in ein Gesamtbild zusammenfassen, so erscheint der Charakterzug, dafs alle Aminosäuren als Stickstoffquelle annähernd gleich maximalen Nährwert haben, wohl verständlich. Es ist in erster Linie nur die stickstoffhaltige Gruppe und ihre nächste Nachbarschaft für die Nährfunktion von Bedeutung, selbst Substitution in der NH_2-Gruppe, oder Anhängung eines Benzolringes vermag nicht in allen Fällen und nur relativ schwach ihre Wirkung als Stickstoffquelle herabzusetzen.

Dies gilt natürlich zunächst nur für den untersuchten Aspergillus niger. Es ist nicht zu bezweifeln, dafs sehr allgemein weitere Untersuchungen an Pilzen und anderen Pflanzen dieselben Ergebnisse zur Folge haben werden. Doch zweifle ich ebensowenig daran, dafs es Fälle geben wird, in denen die verschieden konstituierten Aminosäuren nicht gleich gut wirken, und es hat z. B. schon Hansteen*) angegeben, dafs bei der Eiweifsbildung in Lemna minor wohl Asparagin und Harnstoff günstig wirken, nicht aber Leucin und Alanin. Diese Fälle sind freilich noch eingehend kritisch zu untersuchen, doch werden Differenzen im angedeuteten Sinne bei verschiedenen Pflanzen wohl kaum fehlen. Heute ist es schwer zu entscheiden, inwiefern hierbei sekundäre Einflüsse sich geltend machen. Jedenfalls ist aber der Aspergillus niger ein glücklich gewähltes Versuchsobjekt, da bei ihm die Wirkung der Aminosäuren bei der Eiweifssynthese ganz allgemein und ohne Störung hervortritt.

So sehr die Bedeutung der Aminosäuren als Kohlenstoffquelle

*) B. Hansteen, Ber. d. Bot. Ges. 14, 362 (1896).

bei der Eiweifssynthese des Aspergillus niger zurücktritt, so wichtig ist andererseits die Natur der zweiten nötigen Substanz, die als Kohlenstoffnahrung dient, für den quantitativen Enderfolg und die Schnelligkeit der Eiweifsbildung. Die Zuckerarten überragen, wie orientierende Versuche lehrten, so weitaus an Wirkungswert die anderen Substanzen, dafs bei allen hier bisher erwähnten Versuchen mit binärer Ernährung Rohrzucker zur Verwendung kam. Angaben über den relativen Wert einzelner Substanzen finden sich zwar in allen tabellarischen Zusammenstellungen, die ich im Laufe dieser Arbeiten gegeben habe, doch will ich noch eine Anzahl Daten zur Ergänzung hier beifügen.

Die nachfolgend erwähnten Versuche sind sämtlich mit dreiproz. Lösung der betreffenden Substanz und Zufügung von ein Proz. Asparagin angestellt. Jedes Kölbchen enthielt somit in den 50 ccm eingeführter Nährlösung 1,5 g der Kohlenstoffquelle, 0,5 g Asparagin entsprechend 106,2 mg Stickstoff nebst den nötigen Aschenstoffen, die in gleicher Weise gegeben wurden wie sonst. Die Versuche wurden auch hier nach 22 Tagen eingeerntet und standen im dunkeln Thermostatenraum konstant bei 28° C.

Die Erntezahlen sind daher streng vergleichbar, sie geben auch ein ziemlich genaues Bild der Stickstoffausnutzung, da die Schwankungen des Gesamtstickstoffs der Pilzdecke nur ganz klein waren. Die Umrechnung der Erntegewichte auf den Pfefferschen „ökonomischen Koeffizienten“ geschieht durch Multiplikation mit $^2/_3$.

Auf die interessanten Verhältnisse, welche sich bei der gleichzeitigen Darreichung von zwei oder mehr Kohlenstoffverbindungen ergeben, wurde hier nicht eingegangen. Näheres über die bisher hierüber vorliegenden Erfahrungen ist in Pfeffers*) mehrfach erwähnter ausgezeichneter Studie über „elektiven Stoffwechsel“ einzusehen. Übrigens dürften ähnliche Versuche auch für die Eiweifssynthese noch bemerkenswerte Aufschlüsse geben.

Kohlenstoffquelle	Trockengewicht der Pilzernte mg	Stickstoffausnutzung 100:	Aussehen der Kultur
Methylal $CH_2(OCH_3)_2$	53,5	6,05	Grofse schwarze Rasen

*) W. Pfeffer, Jahrbüch. f. wissensch. Botanik 28, (2) 205 (1895).

Kohlenstoffquelle	Trockengewicht der Pilzernte mg	Stickstoffausnutzung 100:	Aussehen der Kultur
Äthylenglykol $CH_2OH - CH_2OH$	74,3	8,39	Gute geschloss. Pilzdecke
Propylenglykol $CH_3 - CHOH - CH_2OH$	—	—	Kein Wachstum
Glycerin $CH_2OH \cdot CHOH \cdot CH_2OH$	288,6	32,61	Schöne Decke
Glycerose*) . . . . (Lösung nach E. Fischer u. Tafel)	196,8	22,24	Schöne schwarze Decke
α-Erythrit $CH_2OH - C(H)(OH) - C(H)(OH) - CH_2OH$	323,8	36,58	Schöne Decke
l-Arabinose: $OH.CH_2 - C(OH)(H) - C(OH)(H) - C(H)(OH) - COH$	350,0	39,55	Gute Decke
l-Xylose $OHCH_2 - C(H)(OH) - C(OH)(H) - C(H)(OH) - COH$	512,7	57,9	Gute Decke
Rhamnose: $CH_3 - CHOH - C(OH)(H) - C(H)(OH) - C(H)(OH) - COH$	391,2	44,2	Schöne schwarze Decke

*) Vergl. Fischer und Tafel, Ber. chem. Ges. 20, 3386 (1887). Ist ein Gemisch von relativ wenig Glycerinaldehyd $COH - CHOH - CH_2OH$ mit relativ viel Dioxyaceton $CH_2OH - CO - CH_2OH$

Kohlenstoffquelle	Trockengewicht der Pilzernte mg	Stickstoffausnutzung 100:	Aussehen der Kultur
d-Mannit: H H OH OH $OHCH_2-C-C-C-C-CH_2OH$ OH OH H H	416,1	47,0	Schöne schwarze Decke
d-Sorbit: OH H OH OH $OHCH_2-C-C-C-C-CH_2OH$ H OH H H	542,5	61,3	Schöne schwarze Decke
Dulcit: OH H H OH $OHCH_2-C-C-C-C-CH_2OH$ H OH OH H	27,3	3,08	Dürftige konidienlose Rasen
d-Glykose: H H OH H $OHCH_2-C-C-C-C-COH$ . . OH OH H OH	477,1	53,92	Schöne Decke
d-Mannose: H H OH OH $HOCH_2-C-C-C-C-COH$ . . OH OH H H	286,8	32,41	Schöne schwarze Decke
d-Galaktose: H OH OH H $HOCH_2-C-C-C-C-COH$ . . OH H H OH	489,3	55,29	Schöne schwarze Decke
d-Fruktose: H H OH $HOCH_2-C-C-C-CO-CH_2OH$ OH OH H	523,7	59,17	Schöne schwarze Decke

Kohlenstoffquelle	Trocken-gewicht der Pilzernte mg	Stickstoff-aus-nutzung 100:	Aussehen der Kultur
Maltose	550,2	63,30	Schöne schwarze Decke
Milchzucker	138,0	15,60	Schwarze Decke
Raffinose	513,7	58,04	Schöne Decke
Amylum (Lintner)	374,9	42,36	Schöne Decke
Inulin	619,6	70,01	Schöne Decke
α-Glykoheptose: H H OH H H OHCH₂—C—C—C—C—C—CHO OH OH H OH OH	35,4	4,0	Mäfsige Vegetation, reichlich Konidien
d-Glykonsäure: H H OH H OHCH₂—C—C—C—C—COOH . . OH OH H OH	253,8	28,48	Gute Decke
d-zuckersaures Natron: OH H OH OH NaOOC—C—C—C—C—COONa H OH H H	249,8	28,23	Gute Decke
Quercit CH₂ / HOH HOH / HOH HOH / HOH (Ring)	325,0	36,72	Gute Decke

Beim Überblicken dieser aufsteigenden Reihe von hydroxylierten Verbindungen tritt das eminente Übergewicht der Hexosen und ihrer Derivate über die übrigen Stoffe als Kohlenstoffquelle für die Eiweifssynthese von Aspergillus mit voller Deutlichkeit hervor.

Nicht ohne Interesse ist, dafs das Methylal, welches als Dimethoxyläther eines nicht existenzfähigen Methylenglykols gelten darf, zwar nur schwach, aber doch deutlich Kohlenstoff liefert.

Das Ernteerträgnis ist mehr als doppelt so grofs, als wenn der Pilz auf 4 Proz. Asparagin allein kultiviert wird. Da man das Methylenglykol als Reduktionsstufe der Kohlensäure

$$O = C <^{OH}_{OH} \xrightarrow{-O,\ +H_2} H_2C <^{OH}_{OH}$$

betrachten kann, so könnte man vermuten, dafs der Pilz deswegen CO_2 nicht assimiliert, weil er die Reduktion der CO_2 im angegebenen Sinne nicht im Lichte vollziehen kann. Dafs Algen in Methylal Stärke bilden, ist übrigens durch Bokorny und andere Forscher schon längere Zeit bekannt.

Äthylenglykol ist nur sehr schlecht als Kohlenstoffquelle brauchbar, Propylenglykol mit seiner abnormen Kohlenstoffkette gar nicht. Erst Glycerin kann als ein für die Kohlenstoffversorgung sehr tauglicher Stoff bezeichnet werden. Bemerkenswert ist hier wiederum, dafs weder durch die Oxydation zu Glycerinaldehyd und Keton, noch durch Oxydation zur Glycerinsäure die Nährwirkung gesteigert wird. Erst wenn wir ein neues Kohlenstoffglied zufügen, sehen wir im d-Erythrit eine namhaft vermehrte Eignung. Unter den Pentosen finden wir in der l-Xylose bereits eine Substanz, welche dem Traubenzucker an Nährwert ebenbürtig ist; hier ist auch thatsächlich bereits der gröfste Teil des Glukosemoleküls sterisch vorgebildet.

Vielleicht ist die Hypothese berechtigt, anzunehmen, dafs der Pilz nur dann die kohlenstoffdarbietende Substanz zu assimilieren und zur Eiweifssynthese verwenden kann, wenn er daraus Traubenzucker aufzubauen vermag. Bei der l-Xylose bereitet dem Aspergillus offenbar die Hexosensynthese keine Schwierigkeit.

Die beiden Hexite d-Mannit und d-Sorbit sind bemerkenswerterweise den Hexosen an Nährwert wohl gleich; hier spielt also die Weiteroxydation zu Aldehyd und Keton keine Rolle. Hingegen tritt uns im Dulcit bereits eine Substanz entgegen, wo die Oxydation wahrscheinlich auf Hindernisse stöfst, die durch die sterische Konfiguration dieses Hexits gegeben sind. Wenn der Pilz über eine „Aldehydase“ verfügen sollte, so kann dieses Enzym die Konfiguration der Galaktose nicht angreifen. Galaktose selbst steht hinter Traubenzucker an Wert nicht zurück. Wohl aber erwies sich mein (sirupöses) Präparat von Mannose als schlechter nährend als die drei anderen Hexosen; woran dies lag, mufs noch mit Hülfe ganz reiner Mannosepräparate konstatiert werden. Dafs die Derivate der Hexosen zum grofsen Teile gute

Kohlenstoffquellen sind, weiſs man längst; der Pilz vermag sie durch Enzyme rasch in Hexosen zu verwandeln. Ich will noch darauf aufmerksam machen, daſs ich für α-Glykoheptose nur sehr geringen Nährwert fand und daſs Glykonsäure, sowie Zuckersäure etwas schlechtere Kohlenstoffquellen sind als die Aldohexosen selbst. Die Notwendigkeit, sie zu reduzieren, vermindert wahrscheinlich ihre Eignung. Der Quercit als Hexahydrobenzolderivat und fünfwertiger Alkohol kommt etwa dem Erythrit an Nährwert gleich.

Es ist demnach erwiesen, daſs sich die vier untersuchten Hexosen zur Eiweiſssynthese als Kohlenstoffquelle ebenso exceptionell eignen wie die Aminosäuren zur Stickstoffbeschaffung. Der Kern der bekannten, von W. Pfeffer schon 1872 und 1876 aufgestellten Hypothese der „Eiweiſsregeneration aus Asparagin und Kohlehydraten" hat somit auch für Aspergillus eine glänzende Bestätigung gefunden. In den wesentlichen Grundzügen ist der Vorgang der Eiweiſssynthese wohl derselbe bei Phanerogamenkeimlingen und bei Aspergillus niger.

Das nächste Ziel der Erforschung der Eiweiſssynthese: festzustellen, wie sich die Gruppierung der Aminosäurereste und Hexosen zu Proteosen vollstreckt, wird auf dem in dieser Arbeit betretenen methodischen Wege erst dann mit Erfolg experimentell anzugehen sein, wenn man genauere chemische Kenntnis von der Art der Verkettung der Aminosäuren in den Proteosen haben wird.

Bezüglich der Verarbeitung von fertigen Proteosen durch Aspergillus sei bemerkt, daſs wahrscheinlich diese Stoffe in Aminosäuren aufgespalten werden und nicht intakt vom Pilze resorbiert werden. Es ist bei der Darreichung von Proteosen, z. B. Wittepepton, ebenso wie bei den Aminosäuren selbst zur Erreichung des vollen Nähreffektes nötig, gleichzeitig Zucker zuzuführen — eine für den Resorptionsmodus sehr charakteristische Eigentümlichkeit. Damit hängt es auch zusammen, daſs für Aspergillus alle bekannten Proteosen gleich gut geeignet sind.

III.

Über die Einwirkung von Chloroform auf Hämoglobin.

Von Prof. Dr. **Friedrich Krüger** in Tomsk.

(Hierzu Tafel I.)

In seiner Arbeit „Über die Einwirkung von Chloroform und Chloralhydrat auf den Blutfarbstoff“ giebt Formánek an, dafs durch Erwärmen einer wässerigen Oxyhämoglobinlösung auf 50 bis 55° C. und Schütteln derselben mit Chloroform das Hämoglobin quantitativ ausgefällt werden kann *). Späterhin habe ich Gelegenheit genommen, kurz darauf hinzuweisen, dafs sich auch bei Zimmertemperatur durch das genannte Reagens eine ebenso vollständige Ausfällung des Blutfarbstoffes erzielen läfst **).

Ubrigens ist die Beobachtung, dafs das Chloroform ein Fällungsmittel für Hämoglobin ist, durchaus nicht neu, und es mufs Formánek wohl vollkommen entgangen sein, dafs schon im Jahre 1871 Preyer in seinem bekannten Werke „Die Blutkrystalle“ hierüber folgendes schreibt: „Wird eine wässerige Blutkrystalllösung im Probierrohr mit reinem neutralen Chloroform geschüttelt, so sondert sich letzteres hell fleischfarben von jener ab. Nach einigen Stunden (bei etwa 10°) ist die rote Flüssigkeit blafsrot und in ihr ein fleischfarbener Niederschlag sichtbar. Giefst man den Niederschlag ab, so kann man das Röhrchen umkehren, ohne dafs Chloroform ausfliefst. Der Rückstand ist gallertig. Das Spektrum der roten Lösung ist unverändert das des Sauerstoffhämoglobins. Durch Schütteln trennt sich die Gallerte in eine farblose Chloroformschicht und ein fleischfarbenes Gerinnsel. Aus diesen Reaktionen ergiebt sich, dafs durch Schütteln mit Chloroform

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **29**, 416.

) Zeitschr. f. Biologie **41, 341.

das Hämoglobin als fleischfarbenes flockiges Gerinnsel aus seinen wässerigen Lösungen ausgeschieden wird. Durch anhaltendes Schütteln mit genügenden Mengen Chloroform kann man wässerige Hämoglobinlösungen vollkommen entfärben. Zwischen dem farblosen Chloroform und der farblosen Flüssigkeit befindet sich dann sämmtliches Hämoglobin in Form von fleischfarbenen amorphen Flöckchen, welche ihre schöne Farbe bei etwa 8° C. viele (bis acht) Tage behalten. Sie lösen sich nicht in Wasser *).“

Während nun dieser Niederschlag in Wasser unlöslich ist, löst er sich leicht in schwach alkalischen Lösungen, wie z. B. in Sodalösung. Eine solche Lösung zeigt nach Formánek im Spektrum zwei schwache Absorptionsstreifen, die den Bändern des Oxyhämoglobins entsprechen. Auf Zusatz reduzierender Reagentien schwinden diese Streifen, und statt ihrer erscheint das breite Band des reduzierten Hämoglobins, das in der Mitte ein wenig dunkler ist. „. . Die Verstärkung des Hämoglobinstreifens rührte davon her, dafs sich auch ein wenig Hämatin bildete, welches durch Einwirkung von Schwefelammonium Hämochromogen gab, dessen Absorptionsstreifen die Mitte des Hämoglobinstreifens verstärkte“, so heifst es bei Formánek, und daraus zieht er den Schlufs: „Aus diesem Verhalten sieht man, dafs aus dem Chloroformniederschlage des Oxyhämoglobins dieses letztere wieder erhalten werden kann **).“

Dieser Schlufs, nach dem man wohl annehmen darf, alles oder doch nahezu alles Oxyhämoglobin könne aus dem Chloroformniederschlage wiedergewonnen werden, ist jedoch durchaus nicht einwandfrei zu nennen, und es erschien mir sehr wenig wahrscheinlich, dafs das Chloroform ein relativ indifferentes Reagens dem Hämoglobin gegenüber sei und den Blutfarbstoff nur einfach in eine schwerer lösliche Modifikation überführe.

Einerseits erklärt ja Formánek selbst, dafs sich ein wenig Hämatin bilde, was doch auf eine zersetzende Wirkung des Chloroforms zurückzuführen ist, andererseits mufs es auffallen, dafs Formánek nur schwache Oxyhämoglobinstreifen fand, obgleich er es offenbar mit einer verhältnismäfsig recht konzentrierten Lösung zu thun hatte, denn er hat einfach „die obere Schicht des Niederschlages möglichst chloroformfrei abgegossen, durch Zusatz von ein bis zwei Tropfen Soda gelöst“ ***).

*) Preyer, Die Blutkrystalle. Jena 1871, S. 104.

**) l. c., S. 418 und 419.

***) l. c., S. 419.

Durch diese Erwägungen veranlafst, führte ich eine Reihe spektroskopischer Untersuchungen des Chloroformniederschlages aus.

Als Ausgangsmaterial diente mir zweimal umkrystallisiertes, auf der Centrifuge mehrfach ausgewaschenes Pferde- und Hundehämoglobin, das in derselben Weise dargestellt war, wie in meinen früheren Arbeiten angegeben, jedoch ohne Zuhülfenahme von Ammoniak *).

Der Chloroformniederschlag ist, wie schon erwähnt, unlöslich in reinem Wasser; ebenso wenig löst er sich in Neutralsalzlösungen, dagegen leicht in schwach alkalischen Lösungen und in sehr verdünnten Säurelösungen. Beim Neutralisieren fällt er wieder aus.

Es wurden die Spektra sowohl der alkalischen, als auch der sauren Lösungen untersucht.

Bei den vorläufigen Untersuchungen stellte sich heraus, dafs nicht zu konzentrierte alkalische Lösungen des Chloroformniederschlages, die etwa 0,2 Proz. Soda enthielten, im Spektrum zwei schwache Bänder zeigten, die ihrer Lage nach den Absorptionsstreifen des Oxyhämoglobins entsprachen. Das spektroskopische Bild war aber nicht identisch mit dem des Oxyhämoglobins.

Letzteres charakterisiert sich bekanntlich dadurch, dafs der der Linie D anliegende Streifen α schärfer begrenzt und dunkler erscheint als der Streifen β. Bei weiterer Verdünnung der Blutfarbstofflösung schwindet zunächst der Streifen β, während das Band α noch deutlich sichtbar ist.

Die alkalische Lösung des Chloroformniederschlages dagegen giebt ein Spektrum, in dem scheinbar der zweite Streifen (β) eine gröfsere Intensität besitzt als der erste Streifen (α). Verdünnt man die Lösung, so schwinden beide Bänder gleichzeitig, vielleicht sogar Band α etwas früher als Band β.

Hat man konzentriertere Lösungen vor sich, so kann man noch einen Schatten wahrnehmen, der vom Band α aus über die D-Linie hinaus zum Rot hingeht. In sehr konzentrierten Lösungen, die nur noch rotes Licht durchlassen, sah ich zuweilen einen verwaschenen Streifen zwischen den Linien C und D, näher an C.

Auf Zusatz einer gröfseren Menge reduzierender Mittel (Stockes' Reagens oder Schwefelammonium) zu einer mäfsig konzentrierten Lösung des Chloroformniederschlages erscheint sofort das spektrale Bild, das Formánek **) beschreibt, d. h. an

*) Zeitschr. f. Biologie 24, 47 und 318.

**) l. c., S. 418.



Stelle der zwei Streifen ein breites Band mit einer stärkeren Verdunkelung in der Mitte — das Bild der kombinierten Spektra des Hämochromogens und reduzierten Hämoglobins.

Setzt man aber zu derselben Lösung des Chloroformniederschlages nur eine äufserst geringe Menge des reduzierenden Mittels, wird somit eine nur sehr langsam vor sich gehende Reduktion bewirkt, so erhält man zunächst ein ganz anderes Bild und man kann die Entstehung des eben beschriebenen Spektrums sehr gut mit dem Spektroskop verfolgen. Sofort nach dem Zusatz des Reduktionsmittels verliert sich der Schatten, der von dem Streifen α nach C zu geht, und gleichzeitig werden beide Bänder bedeutend dunkler, hauptsächlich das Band α; die Bänder verändern dabei ihre Lage nicht. Man hat vollkommen das Bild des Oxyhämoglobins vor sich.

Bei fortschreitender Reduktion verliert allmählich das Band α immer mehr und mehr an Intensität, während neben ihm im grünen Teil des Spektrums ein neuer Streifen auftritt, nur einen schmalen, helleren Raum zwischen sich und dem Band α lassend; mit abnehmender Intensität des letzteren nimmt die Intensität des ersteren zu, und zuguterletzt verbleibt ein breites, verwaschenes Band, ungefähr den Raum zwischen den Linien D und E einnehmend, sogar über E hinausgehend. Die Mitte dieses Bandes ist stärker verdunkelt. Wir haben das oben beschriebene Bild vor uns.

Durch Schütteln mit Luft wird das ursprüngliche Spektrum wiedererhalten, und es kann wiederum die angeführte Veränderung beobachtet werden.

Schwach saure Lösungen, mittelst sehr verdünnter Essigsäure hergestellt, geben ein dreistreifiges Spektrum. Ein Band liegt im Rot zwischen den Linien C und D, näher zu C; dann folgt ein schmales, sehr undeutliches Band bei D und endlich ein intensiveres, breiteres Band, das in der Mitte zwischen D und E beginnt und sich über E hinaus, beinahe bis zur Linie b, erstreckt.

Dieses Spektrum ist dem des Methämoglobins in neutraler oder saurer Lösung sehr ähnlich. — Hier wie dort haben wir einen Streifen im Rot zwischen den Linien C und D, näher zu C, alsdann ein schwaches Band, entsprechend dem Band α, und ein breiteres und dunkleres Band, entsprechend dem Band β des Oxyhämoglobins *).

---

*) Hinsichtlich der letzteren Streifen mufs ich hinzufügen, dafs von vielen Forschern dieselben nicht als dem Methämoglobin angehörig betrachtet, sondern auf Reste von Oxyhämoglobin zurückgeführt werden. Inwieweit

Dem Spektrum des Methämoglobins wird aber noch ein viertes Band zugeschrieben, das im blauen Teile des Spektrums zwischen den Linien *b* und *F* gelegen ist. Dieses Band habe ich nie bei den sauren Lösungen des Chloroformniederschlages beobachten können, und durch die Abwesenheit dieses Bandes unterscheidet sich, meiner Ansicht nach, unser Spektrum deutlich von dem des neutralen oder sauren Methämoglobins.

Diese Beobachtungen machten eine weitere eingehendere Untersuchung der Spektra des Chloroformniederschlages notwendig.

Bevor ich mich an diese Untersuchungen machte, bestimmte ich zunächst die Lage der Fraunhoferschen Linien in dem Spektrum meines Spektroskopes. Die Skala war derart eingestellt, dafs die Mitte des Linienpaares *D* auf den Teilstrich 50 zu liegen kam. In diesem Falle verteilten sich die Fraunhoferschen Linien folgendermafsen:

Die	Linie	*C*	entsprach	dem	Teilstrich	28,5
"	"	*D*	"	"	"	50,0
"	"	*E*	"	"	"	78,5
"	"	*b*	"	"	"	84,5
"	"	*F*	"	"	"	105,0
"	"	*G*	"	"	"	160,0.

Da die Spektra des Chloroformniederschlages mit den Spektren des Hämoglobins und seiner hier in Betracht kommenden Derivate verglichen werden sollten, mufste, natürlich zunächst für mein Spektroskop, die Lage der Bänder in den betreffenden Spektren festgestellt werden. Es ist selbstverständlich, dafs nur unter absolut gleichen Bedingungen gearbeitet wurde, d. h. bei gleicher Beleuchtung (Auerbrenner), Spaltbreite u. s. w.

Ebenso selbstverständlich ist es, dafs die Spektra des Hämoglobins und seiner Derivate nur unter der Bedingung entsprechender Konzentrationen ihrer Lösungen direkt miteinander vergleichbar sind, d. h. nur dann, wenn die zur Untersuchung gelangenden Lösungen der Hämoglobinderivate in der Volumeinheit die Menge des Derivates enthalten, die dasselbe Volum der zum Vergleich dienenden Hämoglobinlösungen liefert.

Um solche untereinander vergleichbare Lösungen zu erhalten, verfuhr ich derart, dafs ich für die ganze Versuchsreihe zu gleichen

---

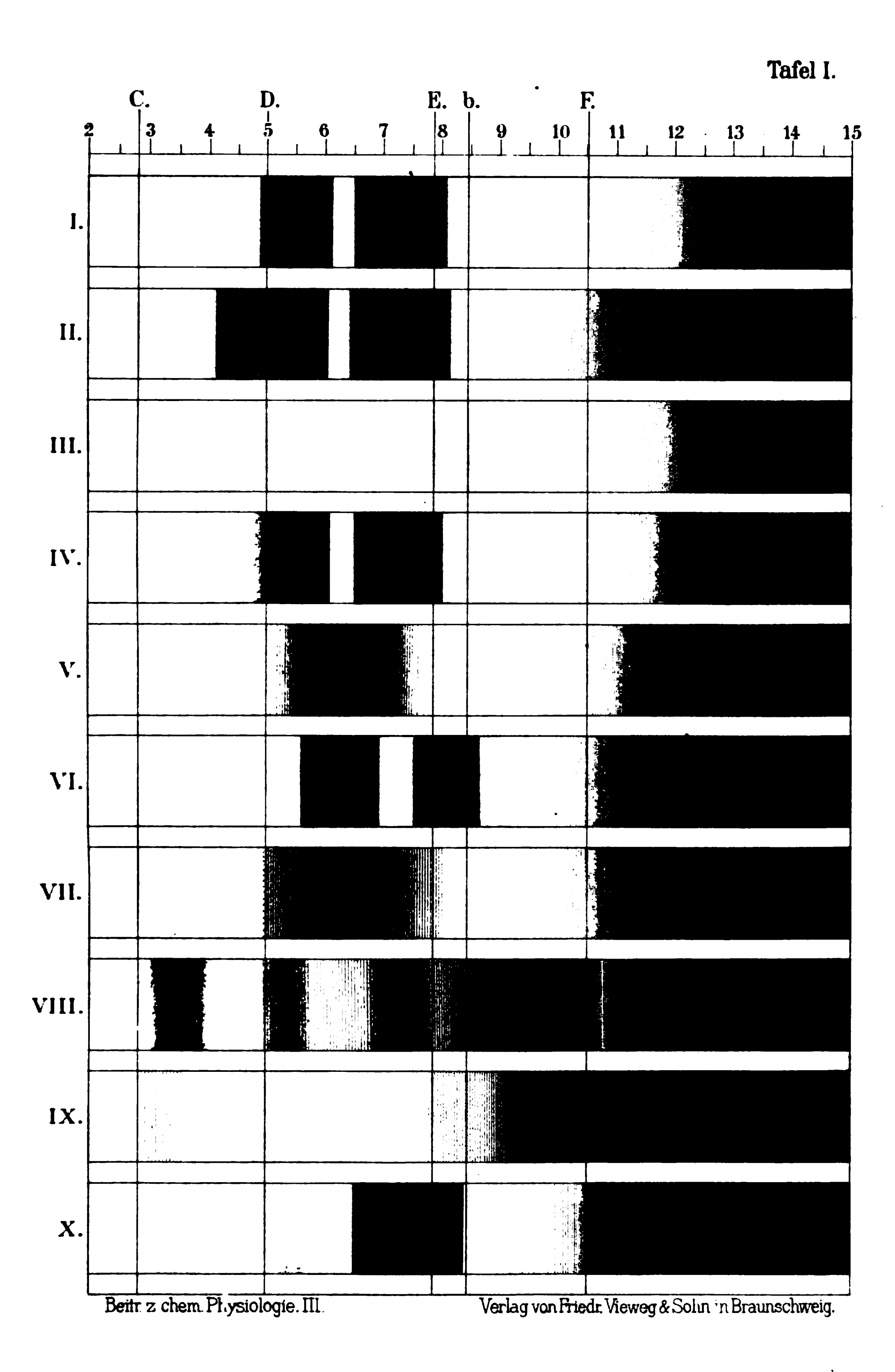
diese Anschauung richtig oder falsch ist, kann ich nicht entscheiden; meiner Ansicht nach harrt diese Frage noch ihrer endgültigen Lösung. Obiges Bild habe ich deswegen angeführt, weil es uns am häufigsten bei der Darstellung des Methämoglobins zu Gesicht kommt.

Mengen der ursprünglichen Hämoglobinlösung stets die gleichen Mengen Wasser resp. Reagens hinzufügte. Wurde z. B. zur ursprünglichen Oxyhämoglobinlösung auf 5 ccm 10 ccm Wasser hinzugesetzt, so erhielt man die Lösung der betreffenden Derivate, indem zu 5 ccm derselben Oxyhämoglobinlösung x ccm Reagens und dann 10 — x ccm Wasser gethan wurden.

Weit schwieriger ist es, eine der ursprünglichen Oxyhämoglobinlösung genau entsprechende Chloroformniederschlaglösung zu erhalten, da geringe Verluste beim Auswaschen desselben auf der Centrifuge fast unvermeidlich sind. Um diese Verluste auf ein Minimum zurückzuführen, verfuhr ich folgendermafsen:

Aus einer abgemessenen Quantität (100 ccm) der ursprünglichen, konzentrierten Oxyhämoglobinlösung wurde der Blutfarbstoff durch Schütteln mit Chloroform vollständig zur Fällung gebracht und nach 24 Stunden die abgestandene, trübe Flüssigkeit vom Niederschlag abgegossen und durch ein Filter von dickem schwedischen Filtrierpapier filtriert. Das Filtrat war stets vollkommen klar und farblos. Der im Mischcylinder zurückgebliebene dicke, breiige Niederschlag, der eine grofse Menge Chloroform in sich schlofs, wurde mit Wasser aufgerührt und in die Gläser der Centrifuge gebracht. Nach ungefähr halbstündigem Centrifugieren bei etwa 1500 Umdrehungen in der Minute haben sich in den Centrifugengläsern drei Schichten gebildet. Die unterste Schicht besteht aus Chloroform, darauf folgt die Schicht des Niederschlages und dann die von suspendierten Partikelchen getrübte Waschflüssigkeit. Letztere wurde abgegossen und gleichfalls durch das oben erwähnte Filter filtriert. Zur Entfernung des abgesetzten Chloroforms wurde der ziemlich fest zusammengeprefste Niederschlag mit einem Glasstabe von den Wänden des Cylinders abgelöst, worauf das Chloroform sich mit Leichtigkeit abgiefsen liefs. Der im Niederschlag zurückbleibende Rest des Chloroforms wurde durch vielfaches (10- bis 15 maliges) Auswaschen auf der Centrifuge entfernt, wobei jedesmal die trübe Waschflüssigkeit durch das gleiche Filter filtriert wurde. War der Niederschlag frei von Chloroform und ein weiteres Centrifugieren überflüssig, so wurde zunächst die auf dem Filter gesammelte geringe Menge des Niederschlages auf dem Filter selbst in möglichst wenig 0,2 proz. Sodalösung zur Lösung gebracht, abfiltriert und einige Mal mit kleinen Portionen Sodalösung nachgewaschen. Das gesamte Filtrat wurde mit dem in den Centrifugengläsern verbliebenen Niederschlag vereinigt und 0,2 proz. Sodalösung bis zum halben Volumen der konzentrierten Hämoglobinlösung, das in Anwendung gekommen war, aufgefüllt. Nach vollständiger Lösung des Niederschlages wurde Wasser hinzugesetzt, bis das ursprüngliche Volumen der Hämoglobinlösung erreicht war. Der Gehalt an Soda in der Lösung des Chloroformniederschlages betrug somit nur 0,1 Proz.

Die saure Lösung wurde entweder in derselben Weise hergestellt unter Anwendung von sehr verdünnter Essigsäure statt



Verlag von Friedr. Vieweg & Sohn in Braunschweig.

der Sodalösung, oder es wurde zur alkalischen Lösung tropfenweise stark verdünnte Essigsäure gethan, bis der sich beim Neutralisieren bildende Niederschlag wieder vollkommen gelöst war.

Aus einer gröfseren Zahl von Versuchsreihen, die stets dasselbe Resultat ergaben, mögen hier zwei in extenso wiedergegeben werden. Die eine bezieht sich auf Pferdehämoglobin, die andere auf Hundehämoglobin.

Es mag noch hinzugefügt sein, dafs es in Bezug auf das spektroskopische Verhalten gleichgültig ist, ob der Chloroformniederschlag bei Zimmertemperatur oder nach Formánek bei 50 bis 55° C. gewonnen wird.

Die Farbstofflösungen wurden in einer Schicht von 1 cm in Fläschchen mit planparallelen Wänden untersucht.

Versuchsreihe A. Pferdehämoglobulin.

Die Hämoglobinlösung, von der ich ausging, enthielt 1,76 Proz. Hämoglobin. Daraus wurden folgende Lösungen hergestellt durch Verdünnen mit Wasser:

Lösung		mit einem Gehalte von		
Lösung	I	mit einem Gehalte von	0,440 Proz.	Oxyhämoglobin,
„	II	„ „ „ „	0,352 „	„
„	III	„ „ „ „	0,264 „	„
„	IV	„ „ „ „	0,176 „	„
„	V	„ „ „ „	0,088 „	„

Diesen Oxyhämoglobinlösungen entsprachen natürlich auch die zu vergleichenden Lösungen der Hämoglobinderivate.

a) Das Spektrum der alkalischen Chloroformniederschlaglösung wurde verglichen mit den Spektren des Oxyhämoglobins, alkalischen Methämoglobins und alkalischen Hämatins.

1. Oxyhämoglobin.

Lösung I. Das Band α lag zwischen den Teilstrichen 49 bis 61 der Skala (λ 591 bis 564), das Band β zwischen 65 bis 81 (λ 555 bis 521). Die absolute Verdunkelung beginnt bei 115—120.

Lösung II bietet ganz dasselbe Bild. Beide Bänder erscheinen nahezu gleich dunkel. α nur schärfer begrenzt. Die gröfste Intensität von α ist um λ 577, von β um λ 536.

Lösung III. Band α zwischen 50 bis 59 (λ 589 bis 571, gröfste Intensität um λ 577); Band β 66 bis 79 (λ 552 bis 526, gröfste Intensität um λ 536). Absolute Verdunkelung beginnt bei etwa 135.

Lösung IV. Band α zwischen 51 bis 58 (λ 586 bis 570, gröfste Intensität wie oben), Band β zwischen 67 bis 76 (λ 551 bis 531). Die absolute Verdunkelung beginnt bei etwa 138—140.

Lösung V. Lage der Bänder wie bei Lösung IV. Die absolute Verdunkelung beginnt bei ungefähr 150. Von Lösung III an erscheint das Band β weniger intensiv als das Band α. Bei weiterer Verdünnung der Oxyhämoglobinlösung schwindet zunächst der Streifen β, während der Streifen α auch bei noch weiterer Verdünnung sichtbar bleibt.

2. Methämoglobin in alkalischer Lösung.

Zur Darstellung des Methämoglobins aus dem Hämoglobin diente Ferricyankalium. Die Lösung wurde mit Soda alkalisch gemacht.

Lösung I. Das Spektrum besitzt drei Streifen. Der erste liegt zwischen 41 bis 47 (λ 617 bis 598) und hat seine gröfste Intensität um etwa 45 (λ 605); der zweite, der mit dem ersten durch einen Schatten verbunden ist, ist zwischen 50 und 60 gelegen (λ 589 bis 566). Seine gröfste Intensität hat er um 55 (λ 577). Der dritte Streifen, der an Intensität dem zweiten gleichkommt, vielleicht sogar ein wenig dunkler ist, hat seine Lage zwischen 65 und 81 (λ 555 bis 521) und ist am dunkelsten um λ 540. Die absolute Verdunkelung beginnt um 100—105.

Lösung II. Die Lage der Bänder ist im allgemeinen die gleiche wie in Lösung I, jedoch erreicht das dritte Band nicht den Teilstrich 81, sondern geht nur bis 79 (λ 525). Die absolute Verdunkelung fängt bei etwa 120 an.

Lösung III. Das erste Band liegt zwischen 42 und 47 (λ 613 bis 598); das zweite zwischen 50 und 59 (λ 589 bis 568), das dritte endlich zwischen 66 und 79 (λ 553 bis 529) und erscheint ein wenig dunkler als das zweite. Die absolute Verdunkelung beginnt bei 125—130.

Lösung IV. Dasselbe Bild wie in Lösung III, nur sind alle Bänder bedeutend schwächer. Absolute Verdunkelung fängt bei etwa 135 an.

Lösung V. Nur ganz schwache Schatten zwischen den Teilstrichen 50 und 60 sowie 67 und 78 zu sehen. Die absolute Verdunkelung tritt bei 145 bis 150 ein.

3. Hämatin in alkalischer Lösung.

Diese Lösung wurde durch Kochen der Hämoglobinlösung mit Natronlauge hergestellt.

Lösung I. Diese Lösung zeigt im Spektrum einen zarten Streifen zwischen 35 und 58 (λ 635 bis 570) mit der gröfsten Intensität um etwa 45 (λ 604). Die absolute Verdunkelung bei etwa 105.

Lösung II. Das Band, das sich von etwa 36 bis 52 (λ 632 bis 584) erstreckt, ist sehr zart und undeutlich begrenzt. Absolute Verdunkelung von 115.

Lösung III. Streifen kaum angedeutet. Absolute Verdunkelung von 130—135 an.

Lösung IV und V. Von einem Bande nichts zu sehen. Die absolute Verdunkelung beginnt bei 150 bezw. 170.

4. Chloroformniederschlag in alkalischer Lösung.

Lösung I. Das Spektrum weist zwei Streifen auf, von denen der eine zwischen 50 und 60 gelegen ist. Von diesem Bande geht ein Schatten nach Rot hin bis etwa zum Teilstrich 43. Der andere Streifen, der dunkler als der erste erscheint, hat seine Lage zwischen 66 und 79. In Wellenlängen ausgedrückt liegt das erste Band zwischen λ 589 bis 566, das zweite zwischen λ 553 bis 525.

Lösung II. Der erste Streifen sehr schwach, zwischen 51 und 59 (λ 589 bis 568) gelegen. Der zweite Streifen ist stärker und liegt zwischen 66 und 78 (λ 553 bis 527). Absolute Verdunkelung von 125 an.

Lösung III. Das erste Band nur angedeutet, das zweite sehr schwach, zwischen 66 bis 76 (λ 553 bis 531). In allen angeführten Lösungen haben die Bänder die gröfste Intensität bei 55 (λ 577) bezw. 72 (λ 540). Absolute Verdunkelung von etwa 135 an.

Lösung IV. Beide Bänder kaum sichtbar. Absolute Verdunkelung beginnt bei 140.

Lösung V. Von Streifen keine Spur. Absolute Verdunkelung von 155 an.

b) Das Spektrum der mit reduzierenden Mitteln behandelten alkalischen Chloroformniederschlaglösung wurde verglichen mit den Spektren des reduzierten Hämoglobins und des Hämochromogens.

1. Reduziertes Hämoglobin.

Als Reduktionsmittel diente Schwefelammonium. In Folgendem ist der Sulfhämoglobinstreifen nicht berücksichtigt worden.

Lösung I. Band zwischen 46 und 76 (λ 600 bis 531); gröfste Intensität um 65 (λ 555). Die absolute Verdunkelung beginnt ziemlich plötzlich bei etwa 125.

Lösung II. Der Streifen nur ein wenig schmaler, von 47 bis 74 (λ 597 bis 536), sonst wie oben. Absolute Verdunkelung von 130 an.

Lösung III. Streifen von 48 bis 72 (λ 594 bis 540). Absolute Verdunkelung von 135 an.

Lösung IV. Grenzen des Bandes schwer zu bestimmen, namentlich zum Rot hin, etwa 50 bis 70. Überhaupt ist es recht schwach, am dunkelsten um 65 (λ 555). Absolute Verdunkelung von 138 an.

Lösung V. Streifen nur schattenhaft zwischen 53 bis 70 zu sehen. Absolute Verdunkelung tritt bei 140 auf.

2. Hämochromogen.

Die Hämochromogenlösungen wurden durch Zusatz von Schwefelammonium zu oben angeführter alkalischer Hämatinlösung hergestellt.

Lösung I. Band α zwischen 56 bis 70 (λ 575 bis 544) ist dunkler als Band β, welches zwischen 75 und 87 (λ 535 bis 512) liegt. Absolute Verdunkelung beginnt bei 110.

Lösung II. Band α zwischen 58 und 68 (λ 570 bis 549) mit gröfster Intensität bei 63 (λ 559); Band β zwischen 76 bis 84 (λ 532 bis 516) mit gröfster Intensität bei 78 (λ 527). Absolute Verdunkelung von 125 beginnend.

Lösung III. Bänder ein wenig schmäler als in der vorhergehenden Lösung; Band β sehr schwach. Beginn der absoluten Verdunkelung bei 135—140.

Lösung IV. Von Streifen nichts wahrzunehmen. Beginn der absoluten Verdunkelung bei 155—160.

3. Chloroformniederschlaglösung nach Einwirkung von Schwefelammonium.

Lösung I. Das Spektrum dieser Lösung zeigt ein breites Band zwischen den Teilstrichen 48 und 83, welches in der Mitte, entsprechend 59 bis 68 (λ 568 bis 549), eine deutlich begrenzte Verdunkelung aufweist. Die gröfste Intensität dieses Bandes im Bande liegt um 63 (λ 560). Vielleicht ist eine zweite Verdunkelung zwischen 75 und 83 vorhanden. Die absolute Verdunkelung fängt bei 120—125 an.

Lösung II. Das breite Band liegt zwischen 50 und 80 (λ 589 bis 523), das Band in ihm zwischen 60 und 67 (λ 566 bis 551). Ein zweiter Streifen ist nicht zu sehen. Absolute Verdunkelung bei 130—135.

Lösung III. Die Grenze des breiten Bandes zum violetten Ende schwer zu bestimmen. Die Verdunkelung in der Mitte nimmt den Teil zwischen 60 und 66 ein (λ 566 bis 553). Die absolute Verdunkelung beginnt bei etwa 135.

Lösung IV. Weder der breite Streifen noch der in ihm gelegene zu sehen. Absolute Verdunkelung bei 155—160 anfangend.

Hinzufügen mufs ich noch, dafs beim Schütteln der reduzierten Lösung mit Luft, bei geeigneter Konzentration, mit grofser Deutlichkeit die Oxyhämoglobinstreifen auftreten. Gleichzeitig rückt die absolute Verdunkelung weiter zum roten Ende des Spektrums vor und zwar um etwa fünf Teilstriche im Vergleich mit der entsprechenden reduzierten Lösung des Chloroformniederschlages.

Die Lage des Bandes im Bande deutet offenbar, wie schon von Formánek vermutet wird, auf die Gegenwart von Hämochromogen.

c) Zum Vergleich mit den sauren Chloroformniederschlaglösungen wurden die Spektren der neutralen resp. sauren Methämoglobinlösung und des Acidhämoglobins herangezogen.

1. Methämoglobin in neutraler Lösung.

Die Darstellung geschah mittels Ferricyankalium. Es wurde neutrale Methämoglobinlösung statt saurer benutzt, was keinen Fehler bedingen kann, da bekanntlich beide Lösungen das gleiche spektrale Bild zeigen.

Lösung I. Im Rot ist ein intensiver Streifen zwischen 31 und 40 (λ 648 bis 620) mit dem Centrum um 36 (λ 632) zu sehen. Dann folgt ein sehr schwaches Band mit schwer bestimmbaren Grenzen, dessen gröfste Intensität ungefähr bei 54—55 (λ 580—578) liegt. Von 65 beginnt wieder eine Verdunkelung, die bei etwa 70—72 ihren Höhepunkt erreicht und sich dann ziemlich gleichmäfsig bis etwa 82 erstreckt. Von 82 bis 108 (λ 520 bis 483) ist ein deutlich begrenztes Band sichtbar, dessen Centrum bei 95 (λ 500) gelegen ist. Sodann folgt eine kleine Aufhellung bis etwa 125, wo absolute Verdunkelung beginnt.

Lösung II. Streifen im Rot zwischen 31 und 39: Centrum 35—36. Das folgende Band nur schattenhaft, mit verwischten Grenzen, erstreckt sich auf ungefähr 50 bis 57. Dann beginnt deutliche Verdunkelung bei etwa 65 und bleibt ziemlich gleichmäfsig bis 81—82. Vielleicht ganz wenig dunkler um 70—72. Das Band in Blau hat seine Grenzen bei 86 und 106 (λ 514 bis 485), der dunkelste Teil liegt um 95. Die absolute Verdunkelung tritt ziemlich plötzlich bei 130 ein. Zwischen den Bändern II, III und IV kommt es nicht zu einer mehr oder weniger vollständigen Aufhellung; sie sind durch Schatten miteinander verbunden.

Lösung III. Band I zwischen 31 bis 38, schlecht begrenzt. Band II kaum sichtbar, Grenzen schwer bestimmbar. Dann ein Schatten zwischen 66 und 75 (Band III), der mit Band IV verbunden ist. Band IV zwischen 88 und 105 (λ 511 bis 470). Absolute Verdunkelung von 135—140 an.

Lösung IV. Nur sehr schwacher Schatten um etwa 35 herum, ebenso zwischen 50 bis 60. Schatten um 70—72 und ganz schwaches Band zwischen 90 und 100 mit Centrum um 95. Die absolute Verdunkelung beginnt bei 140—145.

Lösung V. Kein Band mehr sichtbar. Absolute Verdunkelung bei etwa 150 anfangend.

2. Acidhämoglobin.

Dargestellt durch Erwärmen der Hämoglobinlösung mit ein wenig Essigsäure.

Lösung I. Recht deutliches Band im Rot zwischen 27 und 37 mit dem Centrum um 32 (λ 658 bis 629, Centrum λ 644). Vielleicht

ein schwaches Band zwischen 62 und 75, doch sehr undeutlich, da schon von 60 an starke Absorption beginnt, die bei 105—110 absolut wird.

Lösung II. Schwaches Band im Rot zwischen 28 und 35; vielleicht sehr schwaches Band von 63 bis 74 mit gröfster Intensität um 70. Sonst wie Lösung I. Absolute Verdunkelung von 130 an.

Lösung III. Verunglückt.

Lösung IV. Keine Streifen wahrzunehmen. Absolute Verdunkelung von 140—145.

Lösung V. Keine Streifen. Die absolute Verdunkelung beginnt ziemlich plötzlich bei 160—165.

3. Chloroformniederschlag in saurer Lösung.

Lösung I. Sehr schwaches Band zwischen 31 und 40 mit Centrum um 35 (λ 648 bis 620; Centrum bei 635). Weiter folgt ziemlich gleichmäfsige Beschattung von 50 bis 65, dann ein deutliches Band von 65 bis 82 (λ 555 bis 520) mit gröfster Intensität um etwa 72 (λ 540). Die absolute Verdunkelung beginnt bei 120—125.

Lösung II. Im Rot kein Band wahrzunehmen. Beschattung von 50 an äufserst schwach. Der Streifen zwischen 65 und 81 schwächer als in Lösung I, doch noch deutlich. Absolute Verdunkelung von 130—135 beginnend.

Lösung III. Nur ein schwaches Band zwischen 66 und 80 mit gröfster Intensität um 72 zu sehen. Absolute Verdunkelung fängt bei 140 an.

Lösung IV. Ein Schatten zwischen 66 und 79. Absolute Verdunkelung von 140—145 an.

Lösung V. Von Streifen nichts zu sehen. Absolute Verdunkelung beginnt bei 150—155.

Versuchsreihe B. Hundehämoglobulin.

Die Ausgangslösung enthielt 2,23 Proz. Oxyhämoglobin. Daraus wurden zu den spektroskopischen Untersuchungen acht Lösungen von verschiedener, unten angegebener Konzentration angefertigt. Im übrigen war die Versuchsanordnung dieselbe, wie in der schon angeführten Reihe.

Lösung	I	enthielt	1,115	Proz.	Oxyhämoglobin,
„	II	„	0,743	„	„
„	III	„	0,558	„	„
„	IV	„	0,446	„	„
„	V	„	0,319	„	„
„	VI	„	0,227	„	„
„	VII	„	0,159	„	„
„	VIII	„	0,112	„	„

a) Alkalische Lösungen.

1. Oxyhämoglobin.

Lösung I. Es wird nur rotes Licht durchgelassen. Bei 47—48 fängt die absolute Verdunkelung an.

Lösung II. Von 49 bis 85 sehr dunkles Band, dann wird etwas grünes Licht durchgelassen bis etwa 93; zwischen 95 und 100 wird die Verdunkelung absolut.

Lösung III. Band zwischen 49 und 62, dann ein schmaler grüner Streifen bis 64 und von hier bis 83 ein dunkles Band. Absolute Verdunkelung beginnt bei 105—110.

Lösung IV. Band α 49 bis 61 (λ 591 bis 564); Band β 65 bis 82 (λ 555 bis 520). Absolute Verdunkelung von 115—120 an.

Lösung V. Band α 50 bis 60 (λ 589 bis 566), dunkler als Band β, welches zwischen 65 und 80 (λ 555 bis 523) liegt. Absolute Verdunkelung beginnt bei 125—130.

Lösung VI. Band α 50 bis 60 mit Centrum um 55 (λ 589 bis 566, Centrum λ 577). Band β ist heller, liegt zwischen 66 und 79, das Centrum um 72 (λ 553 bis 525, Centrum λ 540). Absolute Verdunkelung von 135—140 an.

Lösung VII. Dasselbe wie bei Lösung VI. Absolute Verdunkelung von etwa 140 an.

Lösung VIII. Band 51 bis 58, Band 67 bis 78. Centrum wie oben. Beide Bänder schwächer, besonders Band β. Absolute Verdunkelung von 140—145 an.

2. Methämoglobin.

Lösung		
Lösung I.	Absolute Verdunkelung von 35 an.	Kein Streifen.
Lösung II.	„ „ „ 38 „	
Lösung III.	„ „ „ 40 „	
Lösung IV.	„ „ „ 42 „	

Lösung V. Band zwischen 42 bis 60 verbunden mit einem zweiten Bande, das von 65 bis 82 geht. Absolute Verdunkelung fängt bei 100—105 an.

Lösung VI. Verdunkelung von 42 bis 60; sie besteht aus zwei Bändern, die ineinander übergehen; das erste, hellere hat seine gröfste Intensität bei 45 (λ 605), das zweite, bedeutend dunklere bei 54 (λ 579). Dann kommt noch ein Band zwischen 65 und 81 mit der gröfsten Intensität um 72 (λ 555 bis 522; Centrum bei λ 540); dieses Band ist mindestens ebenso dunkel wie das zweite. Die absolute Verdunkelung beginnt bei 120 bis 125.

Lösung VII. Die Bänder ein wenig schwächer, sonst wie bei Lösung VI. Absolute Verdunkelung von 130 an.

Lösung VIII. Der Streifen mit dem Centrum um 45 ist sehr schwach; der zweite und dritte von fast gleicher Stärke. Letzterer hat seine Grenzen bei 67 und 78. Absolute Verdunkelung beginnt bei etwa 140.

Bei weiterer Verdünnung der Lösung schwindet zunächst der erste Streifen, die beiden anderen viel später und fast gleichzeitig.

3. Hämatin.

Lösung I. Ziemlich plötzlich auftretende Verdunkelung von 32 an, die schon bei 40 absolut wird.

Lösung II. Beschattung beginnt bei 34 und bildet bis 60 ein schlecht begrenztes Band mit der gröfsten Intensität um etwa 46. Auch hinter 60 ist das Spektrum recht dunkel; die Verdunkelung nimmt zum violetten Ende hin immer mehr zu und wird schon bei 90 absolut.

Lösung III. Band zwischen 35 und 59 mit gröfster Intensität bei 45 (λ 635 bis 568, am dunkelsten bei λ 604). Es ist nicht stark und nicht scharf begrenzt. Absolute Verdunkelung beginnt bei 105—110.

Lösung IV. Sehr zartes Band mit schwer bestimmbaren Grenzen etwa von 35 bis 57. Die absolute Verdunkelung von 110—115 an.

Lösung V. Band schattenhaft. Absolute Verdunkelung von 115—120 an.

Lösung VI. Band kaum angedeutet. Absolute Verdunkelung von etwa 140 an.

Lösung VII. Kein Band wahrnehmbar. Absolute Verdunkelung beginnt bei 150—155.

Lösung VIII. Absolute Verdunkelung tritt bei etwa 170 auf.

4. Chloroformniederschlag.

Lösung I. Rotes Licht wird bis 43 durchgelassen, von da ab absolute Verdunkelung.

Lösung II. Von 42 an beginnt eine Beschattung, die bis 50 geht; von 50 bis 60 ein Band, das mit einem zweiten, zwischen 65 und 81 gelegenen, verbunden ist. Die absolute Verdunkelung beginnt bei 100—105.

Lösung III. Ein Band zwischen 50 und 60 mit der gröfsten Intensität um 55 (λ 589 bis 566, Centrum λ 577). Von ihm geht ein Schatten zum roten Ende des Spektrums bis 43, der jedoch keine deutliche centrale Verdichtung zeigt. Ein zweites Band liegt zwischen 65 und 80 (λ 555 bis 523) und erscheint am dunkelsten bei 72 (λ 540). Dieses Band giebt scheinbar dem ersten an Intensität nichts nach, sieht sogar eher dunkler aus. Die absolute Verdunkelung nimmt ihren Anfang bei 115.

Lösung IV. Von 43 bis 50 nur äufserst schwacher Schatten. Die Bänder bei gleicher Ausdehnung, wie in Lösung III, etwas weniger dunkel. Absolute Verdunkelung von 120 an.

Lösung V. Beide Bänder ziemlich schwach; der Schatten vom ersten Streifen zum Rot hin nicht mehr zu sehen. Das erste Band nimmt den Bezirk von 51 bis 60, das zweite von 67 bis 78 ein; die gröfste Intensität der Bänder natürlich wie oben. Absolute Verdunkelung von 130—135 an.

Lösung VI. Beide Streifen sehr schwach. Absolute Verdunkelung beginnt bei 140.

Lösung VII. Nur Schatten ohne bestimmbare Grenze um 55 und 71 bis 72. Absolute Verdunkelung von 150 an.

Lösung VIII. Bänder kaum zu sehen, schwinden scheinbar gleichzeitig. Absolute Verdunkelung beginnt bei 155—160.

b) Alkalische Lösungen nach Behandlung mit reduzierenden Mitteln.

1. Reduziertes Hämoglobin.

Lösung I und II. Absolute Verdunkelung beginnt bei etwa 45 bis 46.

Lösung III. Sehr dunkles Band zwischen 46 und 80. Absolute Verdunkelung von 110—115 an.

Lösung IV. Band zwischen 46 und 77. Absolute Verdunkelung von 125—130 an.

Lösung V. Band zwischen 48 und 77; gröfste Intensität um 65—66 (λ 596—533, am dunkelsten bei etwa λ 556). Es tritt die absolute Verdunkelung bei 130 bis 135 ein.

Lösung VI. Band von 49 bis 75. Absolute Verdunkelung von 135—140 an.

Lösung VII. Band etwas heller als in Lösung VI. Absolute Verdunkelung von 140 an.

Lösung VIII. Band sehr schwach von 50 bis 72. Absolute Verdunkelung beginnt bei 140.

2. Hämochromogen.

Lösung I. Beschattung beginnt bei 32, absolute Verdunkelung bei 45—50.

Lösung II. Band zwischen 55 und 92, vielleicht in ihm ein hellerer Streifen zwischen 71 und 75 (?). Absolute Verdunkelung stellt sich bei 105 ein.

Lösung III. Band zwischen 56 und 71, ein zweites zwischen 74 und 91. Absolute Verdunkelung von 110—115 an.

Lösung IV. Das erste sehr scharfe und dunkle Band ist zwischen 57 und 70 gelegen; das zweite Band liegt zwischen 74 und 90; es ist viel heller und weniger scharf begrenzt, als das erste. Die absolute Verdunkelung tritt bei etwa 120 ein.

Lösung V. Das erste Band von 57 bis 69, am dunkelsten um 63 (λ 573 bis 547, am dunkelsten bei λ 559), das zweite Band von 75 bis 86, am intensivsten um 78 bis 79 (λ 534 bis 514. am dunkelsten bei etwa λ 527). Die absolute Verdunkelung beginnt bei 130.

Lösung VI. Bänder etwas schmaler und schwächer, als in der vorhergehenden Lösung, namentlich das zweite Band sehr schwach. Absolute Verdunkelung von 140 an.

Lösung VII. Das erste Band von 60 bis 66, schwach; der zweite Streifen nur als Schatten um 78—80 zu sehen. Absolute Verdunkelung von etwa 145 bis 150 an.

Lösung VIII. Weder der erste, noch der zweite Streifen wahrnehmbar. Absolute Verdunkelung beginnt bei 165—170.

3. Chloroformniederschlag.

Lösung I. Absolute Verdunkelung von 46 an.

Lösung II. Sehr dunkles Band von 46 bis etwa 85. Die absolute Verdunkelung beginnt bei 110. Nach Schütteln mit Luft ein breites Band von etwa 49 bis 83. Absolute Verdunkelung von 95 an.

Lösung III. Breiter Streifen zwischen 48 und 83 mit starker, ziemlich scharf begrenzter Verdunkelung in der Mitte, entsprechend dem Bezirk zwischen den Teilstrichen 57 bis 70; die stärkste Absorption um 63. Absolute Verdunkelung beginnt bei 120.

Nach Schütteln mit Luft zeigt sich das Spektrum des Oxyhämoglobins; die absolute Verdunkelung beginnt früher, bei 110 bis 115.

Lösung IV. Dasselbe Bild, wie bei der vorhergehenden Lösung. Beginn der absoluten Verdunkelung bei 120—125.

Lösung V. Das breite Band geht von 50 bis 80 (λ 589 bis 523), das Band im Bande erstreckt sich von 60 bis 68 (λ 566 bis 549) und hat seine gröfste Intensität bei 63 (λ 560). Die absolute Verdunkelung fängt bei 130 an.

Nach Schütteln mit Luft das Spektrum des Oxyhämoglobins; die absolute Verdunkelung rückt weiter vor bis 125.

Lösung VI. Das Band im Bande relativ deutlich zwischen 61 und 67; der übrige Teil des breiten Bandes nur angedeutet. Absolute Verdunkelung von 130—135 an.

Lösung VII. Nur ein Schatten zwischen 61 und 65 zu sehen. Absolute Verdunkelung nimmt ihren Anfang bei ungefähr 145.

Nach Schütteln mit Luft deutliches Oxyhämoglobinspektrum.

Lösung VIII. Keine Bänder mehr zu sehen. Beginn der absoluten Verdunkelung bei etwa 145—150.

Nach Schütteln mit Luft rückt die absolute Verdunkelung bis etwa 140 vor. Die Oxyhämoglobinstreifen lassen sich deutlich erkennen, doch ist das Band β schon sehr schwach.

c) Saure Lösungen.

1. Methämoglobin.

Lösung I. Rotes Licht wird durchgelassen bis 28, von wo plötzlich absolute Verdunkelung beginnt.

Lösung II. Intensives Band von 29 bis 44, das mit einem zweiten von 50 bis 59 gehenden Streifen verbunden ist. Bei ungefähr 65 tritt absolute Verdunkelung ein.

Lösung III. Fast ganz dasselbe Bild, das auch Lösung II giebt.

Lösung IV. Im Rot ein Streifen zwischen 30 und 41 (λ 651 bis 617), der bei etwa 36 (λ 632) die gröfste Intensität aufweist. Dann folgt ein sehr schwaches zartes Band zwischen 50 und 58 mit dem Centrum um 54 (λ 580). Verdunkelung beginnt bei 65 und wird schon bei 70 absolut.

Lösung V. Der Streifen im Rot liegt zwischen 30 und 40, dann kommt ein schattenhaftes Band zwischen 50 und 57, alsdann fängt bei 65 wieder Verdunkelung an, wird bei 85 stärker; bei 110 wird wieder ein wenig Licht durchgelassen, und bei etwa 120 tritt absolute Verdunkelung ein.

Lösung VI. Band im Rot von 31 bis 40. Vom folgenden Streifen nur eine Andeutung, dann Verdunkelung von 67 bis 108 mit deutlichem Band von 85 bis 108. Absolute Verdunkelung beginnt bei 125—130.

Lösung VII. Band im Rot zwischen 31 und 39 mit gröfster Intensität um 35 bis 36 (λ 648 bis 622, Centrum λ 633). Der zweite Streifen kaum sichtbar. Verdunkelung beginnt bei 67, steigert sich etwa bis 72, um dann wieder ein wenig abzufallen und bei 85 in ein Band überzugehen, das sich bis 108 hinzieht und um 95 am dunkelsten ist (λ 514 bis 483, am dunkelsten um λ 500). Die absolute Verdunkelung beginnt bei etwa 140.

Lösung VIII. Im Rot schwacher Streifen zwischen 32 und 38. Vom zweiten Bande keine Spur. Dann schwache Beschattung um 70 herum, worauf ein ziemlich schwaches Band zwischen 87 und 105 folgt. Beginn der absoluten Verdunkelung bei 145 bis 150.

2. Acidhämoglobin.

Lösung I. Band im Rot zwischen 27 und 39; ist durch einen Schatten verbunden mit der absoluten Verdunkelung, die bei etwa 50 beginnt.

Lösung II. Dasselbe Band im Rot, sonst keine Streifen zu sehen, sondern fortschreitende Verdunkelung, die bei etwa 70 bis 75 absolut wird.

Lösung III. Streifen zwischen 27 und 37 (λ 662 bis 629) mit gröfster Intensität bei 31 (λ 648). Sonst kein Band. Beginn der absoluten Verdunkelung bei 105 bis 110.

Lösung IV. Schwacher Schatten um 30 herum. Absolute Verdunkelung fängt bei 110—120 an.

Lösung V. Kaum wahrnehmbarer Schatten um 30. Beschattung beginnt bei 75—80 und wird bei 125—130 absolut.

Lösung VI. Streifen nicht vorhanden. Absolute Verdunkelung beginnt bei 150—155.

Lösung VII und VIII. Die absolute Verdunkelung nimmt ihren Anfang bei 155—160 resp. bei 160—165.

3. Chloroformniederschlag.

Lösung I. Intensives Band im Rot zwischen 32 und 40, das durch einen Schatten mit der bei etwa 50 beginnenden absoluten Verdunkelung verbunden ist.

Lösung II. Streifen im Rot zwischen 32 und 40 (λ 645 bis 620). Seine gröfste Intensität liegt bei 36 (λ 632). Dann ist vielleicht ein sehr undeutliches Band zwischen 49 und 60 wahrzunehmen, das sich kaum merklich von der Umgebung abhebt und scheinbar direkt in ein recht intensives Band übergeht, welches seine Lage zwischen 64 und 88 hat. Die absolute Verdunkelung beginnt bei etwa 110.

Lösung III. Schwaches Band zwischen 32 und 40. Weiter vielleicht ein Schatten um 58 und alsdann ein Band zwichen 65 und 85. Beginn der absoluten Verdunkelung bei 120—125.

Lösung IV. Das Band im Rot sehr schwach (32 bis 39). Das darauffolgende Band, wenn überhaupt, so nur schattenhaft vorhanden. Sehr deutlich und verhältnismäfsig scharf begrenzt das Band zwischen 66 und 83 (λ 553 bis 518). Es hat seine gröfste Intensität bei 73—74 (λ 538). Die absolute Verdunkelung fängt bei 125—130 an.

Lösung V. Schatten zwischen 30 und 40 mit nicht bestimmbaren Grenzen. Darauf folgt deutliches Band zwischen 66 und 83. Absolute Verdunkelung von 130—135 an.

Lösung VI. Streifen im Rot kaum sichtbar; Band zwischen 70 und 80 als Schatten. Beginn der absoluten Verdunkelung bei etwa 145.

Lösung VII und VIII. Keine Bänder. Absolute Verdunkelung beginnt bei 150—155 resp. bei 160.

Sehen wir uns nun das spektrale Verhalten des Chloroformniederschlages an der Hand der angeführten Untersuchungen und der beigegebenen Spektraltafel näher an.

I. Man beachte zunächst das Spektrum der alkalischen Chloroformniederschlaglösung (Nr. IV der Tafel) und vergleiche es mit dem der Oxyhämoglobinlösung (Nr. I der Tafel). Das Verhältnis der Intensität der beiden Bänder zu einander ist in den beiden Spektren ein verschiedenes. Beim Oxyhämoglobin ist der näher zu *D* gelegene Streifen der dunklere, bei der Lösung des Chloroformniederschlages umgekehrt.

Der Schatten vom Band α zum Rot (Nr. IV der Tafel) könnte entweder von einem Gehalt der Lösung an Methämoglobin oder von einem solchen an Hämatin herrühren. Im ersteren Falle müfste aber, meiner Meinung nach, dieser Schatten zum roten Ende hin eine Verdichtung zeigen und aufserdem die absolute Verdunkelung früher beginnen. Im letzteren Falle wäre es wenig verständlich, warum der Streifen β dunkler erscheint, als der Streifen α.

Wenn es sich jedoch nicht um eine Kombination der Spektra des Oxyhämoglobins, Methämoglobins und Hämatins handelt, so bliebe nur die Annahme übrig, dafs es bei der Wirkung des Choroforms auf Hämoglobin zur Bildung eines Produktes mit besonderen spektralen Eigenschaften kommt.

Zu Gunsten dieser Annahme würde auch der Umstand sprechen, dafs in einigen Fällen (offenbar unter besonders günstigen, nicht näher bekannten Bedingungen) im Spektrum der alkalischen Chloroformniederschlaglösung ein Band im Rot von der gleichen Lage, wie das entsprechende Band des sauren Methämoglobins, beobachtet werden konnte. Ein derartiges Band ist, meines Wissens, für alkalische Lösungen der Blutfarbstoffderivate bisher noch nicht verzeichnet.

II. Nach Zusatz von minimalen Mengen reduzierender Reagentien, wie Schwefelammonium, Stockes' Reagens u. dergl., treten sofort deutliche Streifen des Oxyhämoglobins auf, d. h. es kommt eine Änderung des Spektrums derart zu stande, dafs die ursprünglichen Streifen der Chloroformniederschlaglösung bedeutend an Intensität zunehmen, besonders aber der erste (α), so dafs er dunkler und schärfer begrenzt erscheint, als der zweite (β). Gleichzeitig schwindet der Schatten, der vom ersten Bande (α) sich zum roten Ende des Spektrums hin erstreckt.

Nach mehr oder weniger langer Einwirkung kleinster Mengen des Reduktionsmittels oder sehr schnell nach Zusatz gröfserer Mengen desselben erhält man das schon oben beschriebene Band, das seiner Lage nach dem Bande des reduzierten Hämoglobins entspricht und eine deutlich begrenzte Verdunkelung in seiner Mitte aufweist (Nr. VII der Tafel). Man erhält unwillkürlich den Eindruck, als handele es sich um ein kombiniertes Spektrum, entstanden aus den Spektren des reduzierten Hämoglobins (Nr. V der Tafel) und des Hämochromogens (Nr. VI der Tafel). Daraus müfste man den Schlufs ziehen, dafs der Chloroformniederschlag aus Hämatin und Hämoglobin oder Methämoglobin besteht.

III. Das Spektrum der sauren Chloroformniederschlaglösung (Nr. X der Tafel) habe ich mit den Spektren des sauren resp. neutralen Methämoglobins und des Acidhämoglobins verglichen (Nr. VIII und IX der Tafel).

Hier mufs ich, um Mifsverständnissen vorzubeugen, einige Worte der Erklärung hinzufügen. Es will mir scheinen, als ob hinsichtlich der nächsten Zersetzungsprodukte des Blutfarbstoffes — des Hämatins und des Acidhämoglobins — noch viel Unklarheit herrschte. Natürlich würde es nicht in den Rahmen dieser Mitteilung passen und mich viel zu weit führen, wollte ich die gesamte darauf bezügliche Litteratur heranziehen und kritisch beleuchten. Nur wenige Bemerkungen mögen hier Platz finden.

Über das Spektrum des alkalischen Hämatins scheinen wesentliche Meinungsverschiedenheiten nicht obzuwalten. Anders in Bezug auf die sauren Lösungen desselben.

In der Mehrzahl der Lehrbücher finden wir die Angabe, dafs im allgemeinen die Spektren des Methämoglobins und Hämatins in saurer Lösung annähernd gleich seien: ein Streifen im Rot, zwei Streifen zwischen *D* und *E* und ein vierter Streifen zwischen *b* und *F*. In vielen Lehrbüchern, denen eine Spektraltafel beigegeben ist, begnügt man sich mit der Wiedergabe eines Bildes für beide Farbstoffe, als ob sie ganz identische Spektren hätten (Neubauer und Vogel, Analyse des Harns, 9. Aufl., 1890; Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chemie, 1895). Dieses ist nun ganz entschieden falsch. Wenn auch die übrigen Streifen des Methämoglobins und Hämatins zusammenfallen mögen, so gilt das doch in keinem Falle für das Band im Rot, worauf schon von Harnack aufmerksam gemacht worden ist*). Nach ihm liegt der Streifen des Methämoglobins zwischen *C* und *D*, näher zu *C*, erreicht jedoch höchstens diese Linie, während das Band des sauren Hämatins zwischen *B* und *C* liegt, ohne *C* zu erreichen. Eine Mittelstellung zwischen beiden nimmt in seinem spektroskopischen Verhalten das Acidhämoglobin ein, dessen Band auf der *C*-Linie liegt und sich zu beiden Seiten derselben erstreckt. Für meine mit Essigsäure behandelten Hämoglobinlösungen wählte ich den Namen „Acidhämoglobin“, da ihr Spektrum dem des Acidhämoglobins am nächsten kam.

Erwähnen will ich noch, dafs Ziemke und Müller**) neuerdings für das saure Hämatin ein Spektrum angeben, das aus vier Bändern besteht — einem Bande im Rot zwischen *C* und *D*, näher zu *C*, und drei Bändern zwischen *D* und *E*. Von einem Bande zwischen *b* und *F* ist nichts gesagt.

Das Spektrum der sauren Chloroformniederschlaglösung läfst sich mit keinem der zum Vergleich herangezogenen Spektren in Einklang bringen.

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie **26**, 558.

**) du Bois' Arch., 1901, Suppl.-Bd. S. 177.

Würde der Chloroformniederschlag wirklich, wie Formánek annimmt, zum gröfsten Teile aus Oxyhämoglobin bestehen, so könnte bei der Einwirkung so geringer Mengen Essigsäure, wie sie zur Lösung desselben nötig waren, nicht so schnell das Bild des Oxyhämoglobins schwinden. Ich habe mehrfach Oxyhämoglobinlösungen von annähernd derselben Konzentration, wie die sauren Lösungen des Chloroformniederschlags, mit der entsprechenden Menge Essigsäure angesäuert — die ursprünglichen Streifen schwanden nur sehr allmählich, und man konnte noch lange das Spektrum des Oxyhämoglobins, wenn auch mit allmählich schwächer werdenden Absorptionsbändern, beobachten.

Vom Spektrum des Methämoglobins in saurer Lösung unterscheidet sich das der sauren Chloroformniederschlaglösung hauptsächlich durch das Fehlen des Bandes zwischen *b* und *F*. Vom Spektrum des Acidhämoglobins — durch die andere Lage des Streifens im Rot und durch die Gegenwart der beiden Bänder zwischen *D* und *E*, die miteinander verbunden sind und von denen der violettwärts gelegene der bedeutend dunklere und schärfer begrenzte ist.

Dafs dieses Spektrum nicht aus einer Kombination der Spektren des Acidhämoglobins und Methämoglobins hervorgegangen ist, scheint mir auf der Hand zu liegen.

Ebenso scheint es mir aus allem Angeführten klar zu sein, dafs der Chloroformniederschlag nicht einfach schwerlöslich gewordenes Oxyhämoglobin mit einer kleinen Beimengung von Hämatin darstellt, sondern dafs durch die Einwirkung des Chloroforms noch andere Veränderungen im Hämoglobinmolekül bedingt werden. Welcher Art diese Veränderungen sind, mufs zunächst dahingestellt bleiben.

Bei eingehenderem Studium der Litteratur über das spektroskopische Verhalten der nächsten Hämoglobinderivate bin ich auf sehr viele Widersprüche gestofsen, und auf Grund einiger eigener Beobachtungen sind mir manche Zweifel aufgestiegen. Die Frage nach den optischen Eigenschaften des Blutfarbstoffes bedarf, meiner Ansicht nach, überhaupt einer erneuten und gründlichen Untersuchung unter Zuhilfenahme exakterer Methoden.

Bevor eine solche ausgeführt ist, ist es mir ganz unmöglich, endgiltige und sichere Schlüsse über die Veränderungen, die das Hämoglobin durch die Einwirkung des Chloroforms erleidet, zu ziehen.

Ich mufs mich daher fürs erste mit der Bemerkung begnügen, dafs mir das Chloroform durchaus nicht ein indifferentes Reagens zu sein scheint, das nur das Hämoglobin in eine schwerer lösliche Modifikation umwandelt, ohne es weiter chemisch zu verändern.

Erklärung der Tafel.

I. Oxyhämoglobinlösung.
II. Alkalische Methämoglobinlösung.
III. Alkalische Hämatinlösung.
IV. Alkalische Lösung des Chloroformniederschlages.
V. Lösung von reduziertem Hämoglobin.
VI. Hämochromogenlösung.
VII. Reduzierte Chloroformniederschlaglösung.
VIII. Saure Methämoglobinlösung.
IX. Acidhämoglobinlösung.
X. Saure Lösung des Chloroformniederschlages.

Die Spektren I bis IV entsprechen annähernd der Lösung V, die übrigen der Lösung VI des Hundehämoglobins.

IV.

Über Hämolyse.

Studien über die Wirkungsweise des Staphylolysins.

Von Dr. **Heinrich Schur.**

(Aus dem staatl. serotherapeutischen Institute in Wien.
Vorstand: Prof. R. Paltauf.)

Die in jüngster Zeit erschienenen Arbeiten von Kraus und Ludwig*) über die Einwirkung von Staphylolysinen und Vibriolysinen auf den Organismus bei subkutaner Injektion waren die Veranlassung zu vorliegenden Untersuchungen. Von vornherein mufste es auffallen, dafs es Kraus und Ludwig gelungen war, durch Injektion von 2 ccm eines Staphylolysins, von dem 2 Tropfen blofs 5 ccm einer 5 proz. Blutaufschwemmung vollständig zu lösen vermochten, bei Kaninchen von 1 kg Körpergewicht überhaupt Erscheinungen im Blut hervorzurufen. Die möglichen aprioristischen, d. h. aus den bekannten Angaben ableitbaren Vorstellungen über die Einwirkung des Staphylolysins im Organismus waren vor allem drei:

Die injizierten Lysinmengen lösten erstens thatsächlich so viel, als sie bei obiger Versuchsanordnung in vitro zu lösen im stande waren, also 2 ccm (= ungefähr 40 Tropfen) lösten 5 ccm Blut. War schon diese Annahme im vorliegenden Falle eine aufserordentlich unwahrscheinliche, so war sie nicht einmal geeignet, den Effekt zu erklären. 5 ccm Blut sind etwa der 16. Teil der Blutmenge der verwendeten Kaninchen und man kann eine solche Menge direkt durch Venäpunktion entfernen, ohne dafs im Blut die von Kraus und Ludwig beschriebenen Veränderungen auftreten. Viel wahrscheinlicher war der zweite Fall, dafs sich die 2 ccm Lysin derart

*) Wiener klin. Wochenschrift 1902.

auf das ganze Blut verteilen, dafs jedes Blutkörperchen nur einen kleinen ihm nach Mafsgabe einer gleichmäfsigen Verteilung zukommenden Teil bindet. Dieser kleine Teil hätte dann natürlich zu seiner Auflösung nicht hingereicht und wir hätten erwarten müssen, dafs überhaupt nichts erfolgte. Infolge ihrer grofsen Menge hätten sich die Blutkörperchen gegenseitig in ähnlicher Weise geschützt, wie etwa die Antilysine die Blutkörperchen vor der Giftwirkung schützen. Eine Erklärung der thatsächlich beobachteten Veränderungen hätte infolgedessen diese a priori wahrscheinlichste Vorstellung nicht geboten. Die dritte Vorstellung, dafs nämlich das Lysin ungefähr in gleicher Menge an jedes Blutkörperchen herantritt und aus diesem, nach Mafsgabe seiner Menge, nur einen Teil des Hämoglobins löst, das Blutkörperchen also chlorotisch macht, ohne es vollständig zu zerstören, findet in den gültigen Anschauungen keinen Boden, würde auch nicht zur Erklärung der Blutbefunde ausreichen, da in den Fällen von Kraus und Ludwig eine Oligocythämie auftrat.

Nur unter einer Bedingung schien a priori die Möglichkeit einer Wirkung der Injektion so geringer Mengen Lysin gegeben, nämlich unter der Voraussetzung, dafs das Lysin sich auf sämtliche Blutkörperchen verteilt und diese, wenn auch nicht zur Lösung bringt (da die Menge unzureichend ist), so doch soweit schädigt, dafs sie nachträglich im Organismus auf andere noch unbekannte Art zerstört werden.

Nur die direkte experimentelle Untersuchung konnte über diese Verhältnisse Klarheit bringen. Das Studium der Wirkungsweise des Staphylolysins in vitro erschien mir aber deshalb bedeutungsvoll, weil von demselben nicht nur Aufklärung über diesen Specialfall zu erwarten war, sondern bei der weitgehenden Analogie des Staphylolysins mit den übrigen Toxinen auch eine Übertragung der neu gewonnenen Erfahrungen auf die übrigen Toxine zulässig erschien.

Wenn wir die Wirkungsweise des Lysins im Organismus kennen lernen wollten, handelte es sich vor allem darum, die quantitativen Beziehungen zwischen der Menge des Lysins und der zerstörten roten Blutkörperchen festzustellen, und zwar sowohl bei wechselnden Blutmengen, als auch bei wechselnden Lysinmengen. Ein weiteres Interesse bot dieselbe Frage, wenn die Zeit als zweite Variable verwendet wurde. Diese Untersuchungen brachten es mit sich, dafs Blutkochsalzlösungaufschwemmungen oft bis zu einem Monat stehen gelassen wurden,

und dieser Umstand zwang zu einer Untersuchung über das Verhalten von Blutkörperchenaufschwemmungen in isotonischen Kochsalzlösungen bei wochenlangem Stehen. Als direkte Folgerungen aus den Versuchen ergaben sich dann die Bemerkungen über den fermentativen Charakter des Staphylolysins sowie über die quantitative Auswertung desselben.

In weniger engem Zusammenhang mit diesen Fragen stehen dann die weiteren Untersuchungen über die Veränderungen des Blutes durch Staphylolysin vergifteter Kaninchen und über die diagnostische Verwertbarkeit der gefundenen Veränderungen.

Die Arbeit zerfällt mithin in folgende Abschnitte:

1. Über die quantitativen Beziehungen zwischen der Menge des Lysins und jener der zerstörten roten Blutkörperchen.
2. Über die Veränderungen von Blutkörperchenaufschwemmungen beim Stehenlassen.
3. Über Lysinwirkung als Funktion der Zeit.
4. Über die Fermentnatur des Staphylolysins.
5. Über die quantitative Auswertung des Staphylolysins.
6. Über die Veränderungen des Blutes bei mit Staphylolysin vergifteten Tieren.

1. Über die Beziehungen zwischen der Menge des Staphylolysins und der Menge der zerstörten roten Blutkörperchen.

Für die quantitative Auswertung eines Hämolysins war bis jetzt ganz allgemein üblich die Bestimmung jener Toxinmenge, ausgedrückt durch die Tropfenzahl, welche im stande war, eine bestimmte Blutmenge in isotonischer Kochsalzlösung zur vollen Lösung zu bringen. Die weiteren quantitativen Angaben aus der Litteratur wie: „Kuppe gelöst, Spur, Spürchen gelöst“, sind natürlich so ungenau, dafs sie als halbwegs genaues quantitatives Mafs nicht verwertet werden können. Die Brauchbarkeit dieser Methode zur quantitativen Auswertung wollen wir vorderhand nicht besprechen. Das Eine ist sicher, dafs diese Methode ein Bild über die Lösungskraft eines Lysins gegenüber verschiedenen Blutmengen ebenso wenig geben konnte, als sie im stande war, uns über den Wirkungswert verschiedener Lysinmengen gegenüber derselben Blutmenge aufzuklären. Wir mufsten deswegen nach einem anderen Verfahren zur Bestimmung des Wirkungswertes eines Lysins suchen und fanden dieses in einer Methode, die der von

Madsen*) zur Auswertung des Tetanolysins benutzten sehr ähnlich ist, d. i. in der Bestimmung der durch das Lysin zur Lösung gebrachten Hämoglobinmenge.

Die Bestimmung des Hämoglobins geschah auf colorimetrischem Wege mittels des Hämometers von v. Fleischl. Die Genauigkeit des Instrumentes reicht für diese Zwecke vollständig aus, besonders dann, wenn man, wie dies bei diesen Bestimmungen leicht möglich ist, die Füllung des Troges und die Ablesung mehrere Male bei verschiedenen Konzentrationen vornimmt.

Mehr Schwierigkeit verursachte das Abheben der Hämoglobinlösung von den ungelösten Blutkörperchen. Sie ist um so gröfser, je weniger Lysin zugesetzt wird, da bei Verwendung kleiner Lysinmengen keine vollständige Agglutination der ungelösten Blutkörperchen eintritt und infolge dessen durch den Versuch des Abhebens der überstehenden Flüssigkeitsschicht leicht der Bodensatz aufgerührt wird. Wir mufsten deshalb, um eine klare Flüssigkeit zu erhalten, öfters die abgehobene Flüssigkeit nochmals centrifugieren. War die Agglutination vollkommen, so machte diese das Centrifugieren oft ganz überflüssig.

Zum Abmessen der zur Füllung des Troges zu verwendenden Hämoglobinlösung konnten wir natürlich nicht die dem Fleischlschen Apparate beigegebenen Kapillarpipetten verwenden, da diese viel zu klein sind. Ich verwendete deshalb hierzu eine in $^1/_{100}$ ccm geteilte Pipette von 1 ccm Inhalt und es ergab sich, dafs 1 ccm einer Blutlösung von einem Tropfen Kaninchenblut in 5 ccm 1 promill. Sodalösung gewöhnlich etwa 100 Fleischl ergab. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen für die Hämoglobinwerte zeigen an, wie viel Teile der Fleischlschen Skala 1 ccm der verwendeten Hämoglobinlösung geben würde. Da man mit dem Fleischlschen Apparate nur Werte bis 120 abmessen kann, so ist es selbstverständlich, dafs zur Bestimmung höherwertiger Hämoglobinlösungen kleinere Mengen derselben verwendet werden und die erhaltenen Werte umgerechnet werden mufsten.

Erste Voraussetzung für die Möglichkeit einer derartigen Wertbestimmung des Lysins war, dafs die Färbekraft einer Hämoglobinlösung innerhalb der Beobachtungszeit weder durch das Lysin noch durch das Stehen beeinflufst wird. Da über diese Fragen keine Angaben in der Litteratur existieren, mufste ich diese kleine Vorarbeit selbst ausführen. Sie führte zu folgendem Resultat:

4 Tropfen Kaninchenblut in 1 promill. Sodalösung:

	sofort	nach 1	5	15 Tagen
steril	400	420	410	405
+ 2 Tropfen Staphylolysin	—	410	400	410

In den bakteriell verunreinigten Röhrchen ergaben sich folgende Werte:

sofort	nach 1	5	15 Tagen
400	420	600	700

*) Thorwald Madsen: Zeitschr. für Hygiene XXXII, S. 214 (1899).

Aus dieser Tabelle ergiebt sich die Brauchbarkeit der Methode. Gleichzeitig lehrte die spektroskopische Untersuchung, dafs das Oxyhämoglobin nicht oder nur in Spuren reduziert wird.

Nur hie und da konnte man in den Röhrchen eine eigentümliche kirschrote Färbung bemerken. Diese begann an den untersten Partieen, breitete sich allmählich über das ganze Röhrchen aus, gleichzeitig trübte sich die Flüssigkeit; die spektroskopische Untersuchung ergab den Hämoglobinstreifen. Nach Schütteln mit Luft traten wieder die Oxyhämoglobinstreifen auf. In allen diesen Röhrchen konnten durch Abimpfen Bakterien nachgewiesen werden, während diejenigen Röhrchen, in denen das Oxyhämoglobin nicht reduziert wurde, steril blieben. Ich begegnete dieser Erscheinung auch später noch hie und da bei den Lysinversuchen und konnte nachweisen, dafs auch dort die Reduktion des Oxyhämoglobins zu Hämoglobin an das Auftreten von Bakterien geknüpft war. Regelmäfsig war die Erscheinung zu beobachten, wenn ich zu den Lysinversuchen anstatt der reinen Filtrate direkt die Staphylokokkenkulturen verwendete. In der Litteratur findet sich diese auffallende Verfärbung der Blutlösungen mehrfach erwähnt, so bei Kraus, Marmorek, ohne dafs diese Verfärbung auf ihre Ursuche untersucht worden wäre. Es handelt sich zweifellos dort, wo mit Filtraten gearbeitet wurde, um bakterielle Verunreinigungen, bei den Versuchen, zu denen Kulturen verwendet wurden, wohl um eine Wirkung der zugesetzten lebenden Bakterien. Der Frage, ob sich verschiedene Bakterien in dieser Beziehung verschieden verhalten, ob vielleicht ein Unterschied zwischen aeroben und anaeroben Bakterien existiert, bin ich nicht näher getreten.

Weiter lehrten die Vorversuche, dafs die bakteriell verunreinigten Röhrchen meist nachdunkelten, so dafs, wie aus der Tabelle ersichtlich ist, die bakteriell verunreinigten Röhrchen des oben mitgeteilten Versuches nach 15 Tagen 700 Fleischl ergaben. Die Flüssigkeit gab die Streifen des reduzierten Hämoglobins, nach Schütteln mit Luft jene des Oxyhämoglobins. Neben diesen Streifen konnte in den dunkleren Röhrchen deutlich der Methämoglobinstreifen nachgewiesen werden*). Für mich ergab sich aus diesen Versuchen die unbedingte Pflicht des aseptischen Arbeitens. Freilich kam es auch in aseptisch gehaltenem Blut zum Auftreten von Methämoglobin, aber erst so spät und in so geringem Mafse, dafs dieser Fehler den Wert unserer Bestimmungen nicht beeinträchtigt.

Die Versuche**) gestalteten sich dementsprechend folgendermafsen:

---

*) Ähnliche Beobachtungen machte Nolf. Auch er bezieht das Braunwerden auf das Auftreten von Methämoglobin.

**) Zu den Versuchen wurde überall, wenn nichts anderes angegeben ist, Kaninchenblut verwendet.



Zu 5 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung wurden wechselnde Mengen Bluttropfen und eine wechselnde Anzahl Staphylolysintropfen zugesetzt, die Röhrchen nach 24 Stunden aufgeschüttelt und centrifugiert. In der überstehenden klaren Flüssigkeit wurde das Hämoglobin auf die oben angegebene Weise bestimmt. Gleichzeitig wurde die Fleischlzahl eines in 5 ccm 0,1 proz. Sodalösung direkt vollständig gelösten Bluttropfens bestimmt.

Die Untersuchungen lieferten folgende Resultate:

Anzahl der Bluttropfen	Anzahl der Toxintropfen	Zur Bestimmung verwendete Menge	Direkt abgelesene Fleischlzahl	Berechnete Fleischlzahl pro 1 ccm
1	1	1 ccm	53	53
3	1	1 "	92	92
6	1	0,5 "	65	130
12	1	0.5 "	96	192
24	1	0,5 "	92	184
1	3	1,0 "	92	92
3	3	0,5 "	90	180
6	3	0,3 "	80	267
12	3	0,3 "	90	300
1	5	1,0 "	95	95
3	5	0,3 "	60	200
6	5	0,3 "	107	363
12	5	0,2 "	80	400
1	10	1,0 "	90	90
3	10	0.3 "	70	233
6	10	0,2 "	80	400
12	10	0,2 "	108	540
1	0	1,0 "	<10	<10
3	0	1,0 "	<10	<10
6	0	1,0 "	<10	<10
12	0	1,0 "	<10	<10
24	0	1,0 "	<10	<10

In allen Kontrollpräparaten zeigt sich sehr geringe Hämolyse. Ihr Wert ist nach Fleischl unbestimmbar, da er kleiner ist als 10. In den Eprouvetten ist jedoch deutlich zu sehen, daſs mit steigender Bluttropfenzahl die Lösung des Hämoglobins konzentrierter wird.

Schon eine oberflächliche Betrachtung dieser Tabelle lehrt, daſs zwischen der Toxinmenge und der Menge des gelösten Hämoglobins keine einfache Beziehung besteht. Es lösten durchaus nicht Multipla von Toxinmengen entsprechende Hämoglobinmengen

sondern es zeigte sich das eigentümliche Verhalten, dafs gleiche Mengen Toxin um so mehr Hämoglobin lösten, je mehr Blut ihnen zur Verfügung gestellt wurde, ohne dafs in diesem Versuche jemals volle Lösung aufgetreten wäre, und dafs andererseits aus gleichen Mengen Blut um so mehr Hämoglobin gelöst wurde, je gröfsere Toxinmengen angewendet wurden. Nur eine einzige Bestimmung dieser Tabelle weicht von dieser Regel ab. Bei der Einwirkung von 1 Tropfen Toxin auf 24 Tropfen Blut wurde weniger Hämoglobin gelöst, als bei Einwirkung von 1 Tropfen Toxin auf 12 Tropfen Blut. Auf diese Ausnahme komme ich später wieder zurück.

Aus diesem unerwarteten Versuchsergebnis ergaben sich zwei Fragen:

1. Zeigt sich in der Wirkungsweise konstanter Lysinmengen auf wechselnde Blutmenge irgend eine Gesetzmäfsigkeit und zeigt speziell die Steigerung der Lysinwirkung durch Vermehrung der ihr unterworfenen Blutmenge Grenzen, bezw. giebt es eine Menge Blut, bei der die Wirkung des Lysins durch weitere Blutzugabe abgeschwächt wird?

2. Läfst sich irgend ein Gesetz für den Wirkungswert verschiedener Lysinmengen auf konstante Blutmengen ermitteln?

Der Beantwortung der ersten Frage dienen folgende Tabellen:

Erster Versuch.

		pro Tropfen Blut.
1 Tropfen Toxin löst von 1 Tropfen Blut	88	88
5 „ „	217	43
10 „ „	217	21,7
20 „ „	177	8,85
40 „ „	110	2,75

(1 Tropfen Blut = 94.)

Zweiter Versuch.

Ein zweites Lysin ergab folgende Tabelle:

1 Tropfen löst von 1 Tropfen Blut	85	85
4 „ „	234	58,5
8 „ „	450	56
16 „ „	450	28
2 Tropfen desselben Lysins lösen von 1 Tropfen Blut	81	81
4 „ „	275	69
8 „ „	525	66
16 „ „	800	50

(1 Tropfen Blut = 90.)

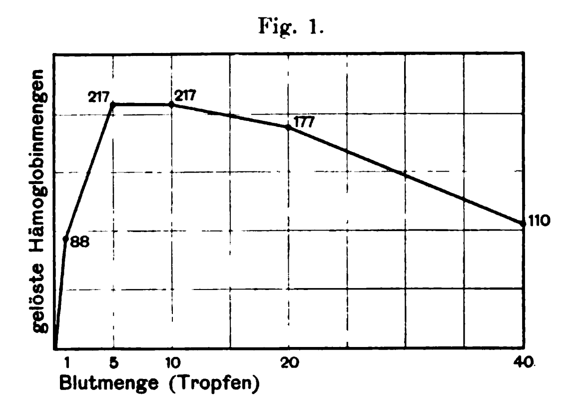
Dritter Versuch.

			pro 1 Tropfen Blut.
1 Tropfen Lysin löst aus	1 Tropfen Blut	90	90
	2 „ „	140	70
	4 „ „	170	42,5
	8 „ „	260	32,5
	16 „ „	350	22
0,5 Tropfen desselben Lysins löst aus	1 Tropfen Blut	85	85
	2 „ „	120	60
	4 „ „	153	38
	8 „ „	190	21
	16 „ „	170	11

(1 Tropfen Blut = 90.)

Da alle weiteren Versuche dasselbe Resultat ergaben, hätte es keinen Sinn, alle diese in extenso anzuführen. Es ergiebt sich aus ihnen für die gestellte Frage, dafs die Menge des nach 24 Stunden von einer bestimmten Toxinmenge gelösten Hämoglobins nur bis zu einem bestimmten Punkte mit der Blutmenge wächst. Von dieser Grenze ab wird dieselbe mit wachsender Blutmenge kleiner. Wenn wir dieses Gesetz graphisch darstellen wollen, so ergiebt sich z. B. aus dem ersten Versuch folgende Kurve.

Fig. 1.



Es giebt also für den Wirkungswert einer bestimmten Toxinmenge ein gewisses Optimum der Wirkung.

Trotzdem in keinem Röhrchen wirklich ganz volle Lösung eingetreten war*), ergab sich in einzelnen Versuchen die Menge des gelösten Hämoglobins beim Optimum bis 10 mal so grofs als

*) Diese Behauptung bezieht sich natürlich nur auf die in dieser Tabelle verzeichneten Versuche.

in dem mit weniger Blut beschickten Röhrchen. Auf diese Weise wäre uns die Wirkung der subkutanen Hämolysininjektionen wohl verständlich geworden, da wir dem verwendeten Hämolysin einen 10 mal so grofsen Wirkungswert zuschreiben konnten, wenn nicht das allmähliche Absinken von diesem Optimum bei weiterem Blutzusatz dieser Erklärung grofse Schwierigkeiten bereitet hätte.

In der letzten Kolumne dieser Tabellen ist die Menge des gelösten Hämoglobins pro Tropfen Blut angegeben. Ein Blick auf die Tabellen lehrt, dafs die Zahlen mit Vermehrung der Blutmengen ganz bedeutend abnehmen. Es zeigt dieser Teil der Tabellen, dafs trotz der anfänglichen Zunahme der absoluten Menge des gelösten Hämoglobins die relative Lösungsfähigkeit des Lysins gegenüber den Blutkörperchen mit der Zunahme ihrer Menge abnimmt. Je geringere Mengen Blutes einer bestimmten Lysinmenge zur Verfügung stehen, um so vollständiger ist die Lösung.

Der Beantwortung der zweiten Frage dienen folgende Tabellen (s. S. 98).

Aus allen diesen Tabellen ergiebt sich Folgendes:

1. Aus gleichen Blutmengen wird um so mehr Hämoglobin gelöst, je mehr Toxin zugesetzt wird.

2. Das Verhältnis zwischen gelöster Hämoglobinmenge und Lysinmenge ist kein einfaches in der Art, dafs der doppelten Menge Lysin die doppelte Menge gelösten Hämoglobins entsprechen würde, sondern es entsprechen im allgemeinen Multiplis von Lysinmengen nicht eben solche Multipla gelösten Hämoglobins, sondern meist etwas weniger, so dafs pro Toxineinheit um so weniger gelöst wird, je mehr Toxin zugegeben wird. Diese Abnahme des Wirkungswertes der Toxineinheit wird um so deutlicher, je höhere Dosen man verwendet, so dafs sich bei hohen Dosen die einfache von der doppelten Dosis in ihrer Wirkung nur mehr wenig unterscheidet. Dieses Gesetz wird in beifolgender Kurve deutlich veranschaulicht und man kann schon aus dem immer sanfter ansteigenden Verlauf dieser Kurve ersehen, dafs bei einigermafsen gröfseren Blutmengen wahrscheinlich die Lösung auch bei Zugabe der allergröfsten Dosen Lysin unvollständig bleibt.

Thatsächlich ergab sich auch in unseren Versuchen, dafs 8 Tropfen Blut selbst bei direkter Aufschwemmung in 5 ccm reinem Lysin nicht ganz vollständig gelöst werden. Es löste z. B. ein solches Lysin in dieser Weise $\frac{700}{800}$, während ein Tropfen desselben Lysins $\frac{300}{800}$ zu lösen im stande war. Sehr deutlich erscheint die enorme Abnahme im Wirkungswert des Lysins bei Verwendung gröfserer Dosen, wenn man

Erster Versuch.

Tropfen Blut	Tropfen Toxin	Fleischl	Differenz gegen 0	Differenz pro 0,1 Tr. Lysin
8	0	40	—	—
8	0,1	50	10	10
8	0,2	80	40	20
8	0,4	123	83	21
8	0,8	200	160	20
8	1,0	230	190	19
8	2,0	290	250	12,5
8	4,0	350	310	7,75

1 Tropfen Blut = 100.

Zweiter Versuch. Ein anderes Toxin.

Tropfen Blut	Tropfen Toxin	Fleischl	Differenz gegen 0	Differenz pro 0,1 Tr. Lysin
8 Tropfen desselben Butes wie in Versuch 1.	0	40	—	—
	0,1	68	28	28
	0,2	110	70	35
	0,4	165	125	31
	1,0	330	290	29

Dritter Versuch. Ein drittes Toxin.

Tropfen Blut	Tropfen Toxin	Fleischl	Differenz gegen 0	Differenz pro 0,1 Tr. Lysin
8 Tropfen anderes Blut. 1 Tropfen Blut = 100.	0	32	—	—
	0,1	38	6	6
	0,2	100	68	34
	0,4	123	91	23
	0,5	167	135	25
	0,8	225	193	22

Vierter Versuch.

Tropfen Blut	Tropfen Toxin	Fleischl	Differenz gegen 0	Differenz pro 0,1 Tr. Lysin
8 Tropfen Blut. 1 Tropfen Blut = 95.	0	unbestimmbar < 10	—	—
	0,1	unbestimmbar < 10	—	—
	0,5	43	43	8,1
	1,0	128	128	12,8
	2,0	195	195	9,8

beachtet, dafs die Vermehrung der gelösten Hämoglobinmenge durch Steigerung der Toxinmenge nicht blofs pro Toxineinheit absolut kleiner wird, sondern auch einen kleineren Teil des mit der vorhergehenden Toxinmenge nicht gelösten Restes bedeutet.

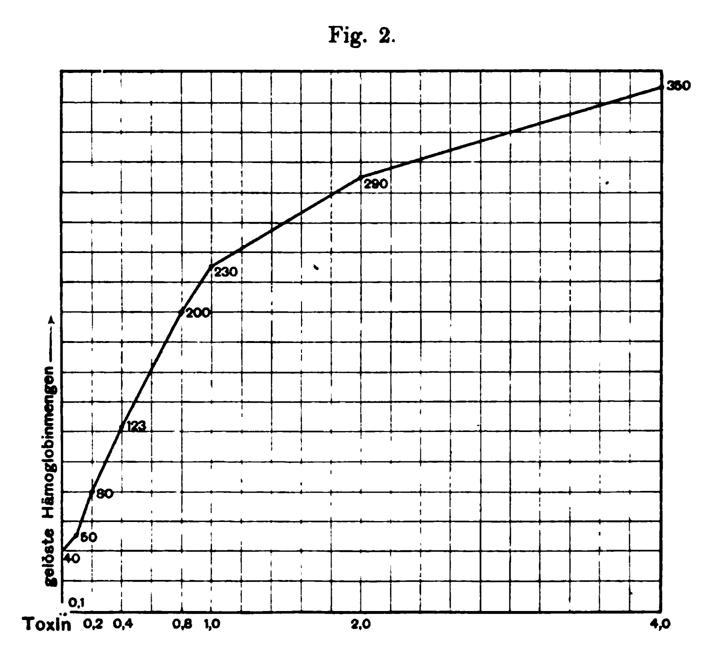
Es lösen z. B. 1 Tropfen $230 = \frac{800}{3,5}$

2 „ $290 = 230 + 60 = \frac{800}{3,5} + \frac{570}{9,5}$

4 „ $350 = \frac{800}{3,5} + \frac{570}{9,5} + 2\,\frac{510}{17}$.

Dieses Gesetz gilt, wie aus den Tabellen und dem nach oben offenen Winkel am Beginn der Kurve ersichtlich ist, erst von einem bestimmten Punkte. Bis zu diesem wächst mit der Menge des Toxins die Menge des pro Toxineinheit gelösten Hämoglobins. Diese Ausnahme bedeutet im wesentlichen nichts anderes als die in den früheren Versuchen gefundene Abnahme der Menge des gelösten Hämoglobins bei Verwendung relativ großer Blutmengen. Daſs 0,1 Tropfen Toxin auf 8 Tropfen Blut pro Toxineinheit weniger stark wirkt als 0,2 Tropfen, ist im Grunde gleichbedeutend mit der Thatsache, daſs 1 Tropfen Toxin aus 40 Tropfen Blut weniger Hämoglobin löst, als aus 20. Wir sehen

Fig. 2.



also als allgemeines Gesetz: Die Lösungskraft steigender Lysinmenge auf konstante Blutmenge steigt bei den kleinsten Mengen pro Lysineinheit zuerst etwas an, wird dann bei mittleren Dosen relativ konstant, um dann bei gröſseren Dosen stark abzufallen, so stark, daſs bei gröſseren Blutmengen selbst nicht durch die gröſsten Lysinmengen auch nur annähernd vollständige Lyse erzielt werden kann.

Worauf diese eigentümliche Wirkungsweise des Lysins zurückzuführen ist, läſst sich vorderhand nicht sagen. Wir haben schon

in den einleitenden Worten erwähnt, dafs man von vornherein im Sinne der bestehenden Lehre ein Gesetz der einfachen Proportionen, resp. Abnahme der Wirkungen bei zu grofser relativer Verdünnung des Toxins hätte erwarten dürfen.

2. Über die spontan auftretende Hämolyse.

Limbeck*) schreibt in seinem Buche, dafs es ihm bekannt sei, dafs sich die normalen Blutkörperchen in isotonischen Kochsalzlösungen und selbst in ihrem eigenen Serum bei längerem Stehen allmählich auflösen, auch dann, wenn die Proben aseptisch aufbewahrt werden. Auch Nolf**) erwähnt in seiner Arbeit über den Mechanismus der Globulolyse die Autolyse als Thatsache. Ich hielt es für zweckmäfsig, diese bei beiden Autoren nur mit einigen Worten erwähnte Angabe nachzuprüfen, und wenn sich eine spontane Hämolyse ergab, ihren quantitativen Ablauf zu studieren.

Das Resultat der bezüglichen Versuche giebt folgende Tabelle wieder:

Erster Versuch.

8 Tropfen Kaninchenblut in 5 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung geben:

sofort	nach 24 Stunden	nach 5 Tagen	nach 8 Tagen	nach 11 Tagen	nach 13 Tagen
0	0	0 deutlich gefärbt < 10	110	385	700

8 Tropfen in Sodalösung = 800.
Am elften Tage deutliche Agglutination.

Zweiter Versuch.

8 Tropfen Kaninchenblut in 5 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung geben:

sofort	nach 1 Tage	nach 2 Tagen	nach 5 Tagen	nach 7 Tagen	nach 9 Tagen	nach 15 Tagen
30	30	30	30	30	46	430

8 Tropfen = 800. Am 15. Tage deutliche Agglutination.

Das Blut wurde für die Zwecke dieser Untersuchungen unter besonders peinlichen Vorsichtsmafsregeln aseptisch erhalten. In jedem Versuch wurde durch nachträgliches Abimpfen auf Agarröhrchen absolute Sterilität festgestellt.

*) Limbeck, Grundrifs einer klin. Pathol. des Blutes. 2. Aufl. 1896.
**) Annales de l'institut Pasteur 1900.



Es ergiebt sich aus den Tabellen vor allem mit voller Sicherheit die Existenz einer aseptischen spontanen Hämolyse. Es tritt nach einer mehrtägigen Inkubationsdauer, wenn man so sagen darf, eine langsam sich steigernde Lösung auf.

Wie dieser Vorgang genetisch aufzufassen ist, soll hier nicht näher besprochen werden. Zweifellos hängt die Erklärung dieser Hämolyse stark von der Auffassung der sonstigen hämolytischen Vorgänge ab. Wir können uns mithin mit Nolf vorstellen, dafs es sich um eine durch das Wasser hervorgerufene physikalische Änderung des Stromas der Blutzellen oder, wie Limbeck andeutet, um eine allmähliche Spaltung des von Hoppe-Seyler*) in den Blutkörperchen supponierten Arterins handelt. Nolf selbst giebt an einer Stelle seiner grofsen Arbeit über den Mechanismus der Globulolyse an, dafs er diese Spontanhämolyse bezw. die Imbibition der Blutkörperchen mit Wasser als Folge des Eindringens der Alexine des eigenen Serums auffafst. Aus unseren Versuchen ergiebt sich nur, dafs sie sich im zeitlichen Ablauf sowie in ihrer Paarung mit Agglutination als ein Analogon der durch Einwirkung der spezifischen Lysine hervorgerufenen Lösung darstellt. Eine Erklärung in Nolfs Sinne könnte nur durch den Nachweis der Hämautolysine selbst, z. B. durch den Nachweis spezifischer Antikörper sichergestellt werden. Was wir nachweisen können, ist blofs die spontane Lösung**).

Zweifellos besteht aber eine Analogie in dieser aseptischen spontanen Hämolyse mit der von Salkowski aufgefundenen und in der Hofmeisterschen Schule weiter ausgebildeten Lehre von der aseptischen Autolyse der Organe. Diese Analogie wird um so vollständiger, wenn man mit Limbeck das Auftreten gelösten Hämoglobins als Ausdruck der Spaltung des von Hoppe-Seyler angenommenen Arterins (resp. Phlebins) betrachtet.

Über die Möglichkeit, die quantitativen Verhältnisse bei der Spontanhämolyse durch die Temperatur und Konzentration der Blutaufschwemmungen zu beeinflussen, geben folgende Tabellen Aufschlufs.

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 13.

**) Die Bezeichnung Autolyse könnte die Vermutung hervorrufen, dafs wir an durch den Zerfall von roten Blutkörperchen im selben Organismus erzeugte Autolysine denken. Das ist nicht der Fall. Dafs es derartige Autolysine gäbe, ist aufserordentlich unwahrscheinlich. Ist die Autolyse durch Lysine hervorgerufen, so kann man nur an fremde resorbierte Lysine (wie z. B. in unseren Tierversuchen das Staphylolysin) oder an nicht auf die oben angegebene Weise im Organismus entstandene Lysine denken.

Erster Versuch.

Bluttropfenmenge	Lösung nach 4 Tagen	Lösung nach 6 Tagen	Lösung nach 8 Tagen	
1	95 fast vollständ. gelöst	110 vollständ. gelöst	110	Temperatur des Versuches 32°
4	220	370 fast vollständ. gelöst	650	
8	270	650	—	
1	10	10	50	Temperatur des Versuches: Zimmertemperatur
4	20	20	30	
8	30	30	30	

Ein Tropfen Blut = 105.

Zweiter Versuch.

Bluttropfenmenge	Lösung nach 1 Tage	Lösung nach 2 Tagen	Lösung nach 3 Tagen	
1	< 35	70	135 vollständig gelöst	Temperatur des Versuches 32°
4	< 35	106	300	
8	35	78	400	
1	< 10	< 10	< 10	Temperatur des Versuches: Zimmertemperatur
4	< 10	< 10	< 10	
8	20	20	20	

Aus diesen Tabellen ist vor allem ein enorm beschleunigender Einfluſs der höheren Temperatur ersichtlich. Für das Verhältnis der gelösten Hämoglobinmenge zur Konzentration der Blutaufschwemmung ergiebt sich Folgendes: Die aus verschiedenen Blutmengen in gleichen Zeitabschnitten gelösten Hämoglobinmengen differieren in den Versuchen, bei denen es in keinem der Röhrchen zu annähernd vollständiger Lyse gekommen ist, nur wenig voneinander. Meist findet sich in den konzentrierteren Blutaufschwemmungen mehr gelöstes Hämoglobin. Doch kommt auch das Gegenteil vor. Besonders bei kurzer Dauer des Versuches zeigte sich oft — auch in Versuchen, die hier nicht beschrieben sind — stärkere Lösung in den Röhrchen, die mit verdünnteren Blutaufschwemmungen gefüllt waren.

Als Ursache dieser Erscheinung ist eine die Lösung hemmende Einwirkung des Serums zu vermuten. Doch kann ich diese Ansicht nicht bestimmt aussprechen, da ich keine bezüglichen Versuche angestellt habe. Eine solche Annahme könnte das Phänomen

erklären, da die konzentrierten Blutaufschwemmungen selbstverständlich auch mehr Serum enthalten müssen.

Ein Versuch über den Einfluſs verschiedener Konzentration der zu den Aufschwemmungen verwendeten Kochsalzlösungen zeigte keine wesentliche Verschiedenheit in dem zeitlichen Ablauf der Hämautolyse bei Lösungen von 7, 8,5, und 10 pro Mill.

3. Über den zeitlichen Ablauf der Staphylolysinwirkung.

Die vorstehenden Untersuchungen haben ergeben, daſs die Wirkung der Spontanhämolyse innerhalb der ersten Tage bei Zimmertemperatur so gering ist, daſs sie die Resultate der in dieser Zeit mit dem Staphylolysin bei Zimmertemperatur angestellten Versuche nicht wesentlich zu beeinflussen vermag. Die Resultate dieser Untersuchungen ergeben sich aus folgenden Tabellen.

Erster Versuch.

	nach 24 Stunden			nach 48 Stunden		
		Differenz gegen den Nullwert	Differenz pro 0,1		Differenz gegen den Nullwert	Differenz pro 0,1Tr. Lysin
8 Tropfen Blut + 0 Tropf. Lysin	40	—	—	40	—	—
+ 0,1	50	10	10	79	39	39
+ 0,2	80	40	20	117	77	39
+ 0,4	123	83	21	203	163	41
+ 0,8	200	160	20	220	180	22
+ 1,0	230	190	19	253	213	21
+ 2,0	290	250	12,5	333	293	15
+ 4,0	350	310	7,8	425	385	9,6

Zweiter Versuch.

8 Tropfen Blut + Lysin nach Tagen:

Lysinmenge	0 Tag	1 Tage	Differenz pro 0,1	3 Tagen	Differenz pro 0,1	5 Tagen	Differenz pro 0,1	8 Tagen	Differenz pro 0,1	11 Tagen	Differenz pro 0,1
0	30	30	—	30	—	30	—	30	—	60	—
0,1	—	27	0	87,5	57,5	117	117	180	150	220	160
0,5	—	184	31	220	38	260	46	320	58	525	93
1,0	—	290	26	320	29	380	35	510	48	550	49
2,0	—	400	18,5	400	18,5	480	22,5	570	27	590	26,5

Dritter Versuch.

1 Tropfen Blut = 100.

Tropfen Lysin	Tropfen Blut	nach 1 Tage	nach 3 Tagen	nach 5 Tagen
0,2	1	90	92	—
0,2	4	265	230	300
0,2	8	395	385	550
0,2	16	350	560	740
0	16	60	60	60

Aus allen diesen Versuchen folgt, dafs die Menge des durch eine bestimmte Lysinmenge aus einer bestimmten Blutmenge gelösten Hämoglobins mit der Zeit der Einwirkung langsam aber

Fig. 3.

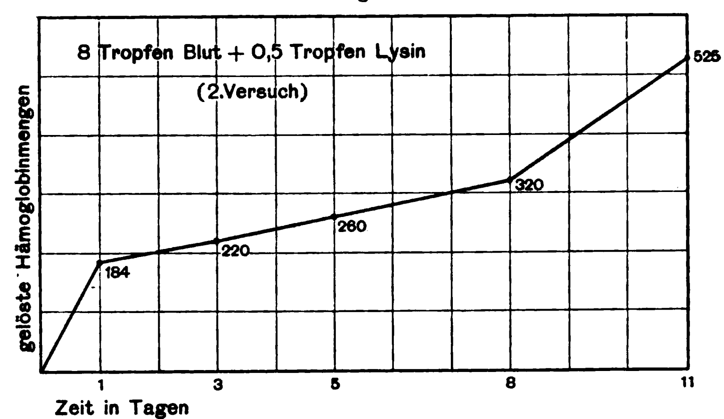


Fig. 4.

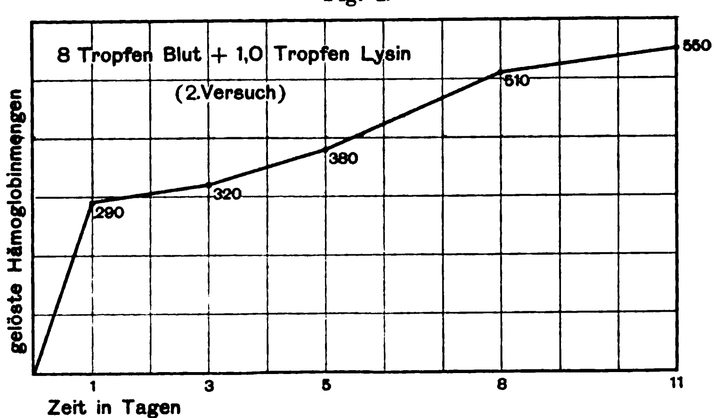
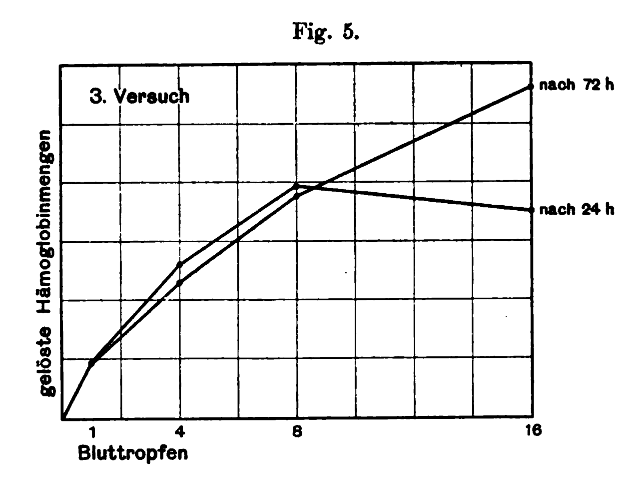


Fig. 5.



stetig wächst. Diese Steigerung der Wirkung ist um so deutlicher, je kleiner der Quotient $\frac{\text{Lysin}}{\text{Blutmenge}}$ ist, so dafs die Wirkungen verschiedener Toxinmengen auf gleiche Blutmengen einander immer näher kommen. Ist der Quotient $\frac{\text{Lysin}}{\text{Blutmenge}}$ sehr grofs, so wird das Wachsen der gelösten Blutmenge sehr bald fast unmerklich. Wir sehen deshalb, z. B. im zweiten Versuch, am ersten Tage einen sehr grofsen Unterschied im Wirkungswerte verschiedener Lysinmengen. Dieser Unterschied wird nach dem oben angeführten Gesetz immer kleiner, da die durch die kleineren Lysinmengen gelösten Hämoglobinmengen mit der Zeit wachsen und den durch grofse Lysinmengen sehr früh erhaltenen Wert später auch erreichen. Es folgt mithin aus diesen Versuchen, dafs sich der Wirkungswert einer bestimmten Lysinmenge hauptsächlich in der Schnelligkeit äufsert, mit der die durch ihn hervorgerufene Wirkung erfolgt. Wir haben in früheren Versuchen gesehen, dafs der Wirkungswert des Staphylolysins bei 24 stündiger Einwirkung nur bis zu einem gewissen Maximum mit zunehmenden Blutmengen steigt, um dann wieder abzufallen, und haben in dieser Thatsache eine grofse Schwierigkeit für die Erklärung der thatsächlich vorhandenen intravitalen Einwirkung erblickt. Diese Schwierigkeit fällt weg, wenn wir sehen, dafs bei genügend langer Dauer die Wirkung auch kleiner Mengen fast unbegrenzt wächst. Wir sehen z. B. in der 3. Tabelle dieses Abschnittes, dafs bei 24 stündiger Einwirkung 0,2 Tropfen Lysin aus 16 Tropfen Blut weniger Hämoglobin lösen

als aus 8 Tropfen. Bei dreitägiger Einwirkung ändert sich dieses Verhältnis vollständig. Dasselbe Verhalten zeigt sich auch in den Versuchen der 1. und 2. Tabelle, wenn man auf den Wirkungswert von 0,1 Tropfen Lysin bei verschiedener Einwirkungsdauer achtet. Wir können mithin sagen: Je länger ein Lysin einwirkt, um so allgemeiner gilt das Gesetz, dafs der Wirkungswert des Lysins mit zunehmender Blutmenge wächst. Diese fermentartige Wirkungsweise dürfte die Ursache der intravitalen Wirkung kleiner Lysinmengen sein.

4. Über die Fermentnatur des Staphylolysins.

Aus den Versuchen und Auseinandersetzungen des vorhergehenden Kapitels folgt mit Sicherheit, dafs für die Wirkungen des Lysins auf die roten Blutkörperchen nicht ausschliefslich Beziehungen mafsgebend sein können, die dem Gesetz der multiplen Proportionen folgen. Die enorme Veränderlichkeit des Wirkungswertes des Lysins unter den verschiedensten äufseren Umständen zeigt uns, dafs es sich bei der durch das Lysin hervorgerufenen Hämolyse um die Wirkung eines katalytisch wirksamen Agens handeln mufs, und es fragt sich jetzt nur, welcher Natur dieser Katalysator ist, ob das Staphylolysin als ein echtes Ferment aufzufassen oder in die Gruppe der elementaren, nach Art des Wasserstoffions wirksamen Katalysatoren einzureihen ist.

Die Beantwortnng dieser Fragen kann uns nur ein genaueres Studium der Tabellen und eine Vergleichung der Wirkungsweise unseres Lysins mit der Wirkungsweise anderer Fermente geben.

Nach dem Gesetz von Guldberg und Waage müssen die durch einfache Katalysatoren beschleunigten Prozesse als monomolekulare Reaktionen in ihrem Verlaufe einer logarithmischen Kurve folgen, d. h. so verlaufen, dafs die in einer unendlich kleinen Zeit chemisch veränderte Menge der in diesem Zeitpunkt unverändert vorhandenen Menge proportional ist. Wenn wir nun die Wirkungsweise unseres Staphylolysins daraufhin untersuchen, so sehen wir, dafs es in seiner Wirkungsweise ganz anderen Gesetzen folgt. Wenn wir z. B. aus der zweiten Versuchsreihe des vorhergehenden Abschnittes die Reihe, die aus der Einwirkung von 1 Tropfen Lysin auf 8 Tropfen Blut hervorgeht, näher betrachten, so ergeben sich folgende Zahlenwerte:

Zeit in Tagen	absolute Menge des gelösten Hämoglobins	Zuwachs gegenüber der vorhergehenden Bestimmung	$\frac{\text{Zuwachs}}{\text{Rest}}$ pro Tag (Mittelwert)*)
1	290	290	$\frac{290}{800} = 0{,}35 \quad k = 0{,}45$
3	320	30	$\frac{15}{510} = 0{,}03 \quad k = 0{,}030$
5	380	60	$\frac{30}{480} = 0{,}06 \quad k = 0{,}067$
8	510	130	$\frac{43}{420} = 0{,}10 \quad k = 0{,}123$
11	550	40	$\frac{13}{290} = 0{,}04 \quad k = 0{,}0494$

Wir sehen aus dieser Tabelle, dafs der Quotient $\frac{\text{Zuwachs}}{\text{Rest}}$ zuerst rapid abnimmt, um vom dritten Tage an wieder allmählich anzusteigen. Vom achten Tage an fällt dieser Quotient wieder.

Aus diesem eigentümlichen Reaktionsablauf ergiebt sich, dafs es sich in diesem Falle um zwei gleichzeitig einsetzende Prozesse handeln mufs, von denen der eine sehr rasch ansteigt und sehr bald wieder gehemmt wird, während der andere erst nach längerer Inkubation in Erscheinung tritt und dann allmählich mit zuerst steigender, später wieder fallender Beschleunigung ansteigt. Der erste Anstieg entspricht unzweifelhaft der Wirkung des Lysins, der zweite ist Ausdruck der Spontanhämolyse. Es folgt also aus diesem Versuche, dafs die Wirkung des Staphylolysins ähnlich wie die vieler Fermente allmählich gehemmt wird und infolgedessen unvollständig ist. Diese Unvollständigkeit der Reaktion kann sich jedoch bei den Lysinversuchen nicht so deutlich ausprägen, weil der schon spontan ablaufende Prozefs mit einer relativ grofsen Geschwindigkeit verläuft. Die eintretende spontane Hämolyse ver-

*) Die Berechnung der Mittelwerte ist selbstverständlich streng mathematisch nicht zulässig. Da aber die Zeitintervalle zwischen den einzelnen Versuchen nicht stark differieren, können wir sie für unsere Zwecke verwenden. Die genau berechnete Konstante der für jede einzelne Bestimmung supponierten Gleichung $\frac{dx}{dt} = kx$ ist sub $k =$ angegeben. $\left[k = \frac{1}{t_2 - t_1}\, l\, \frac{C_1}{C_2}\right]$. Der Quotient $\frac{\text{Zuwachs}}{\text{Rest}}$ ist selbstverständlich nicht gleich k, müfste aber bei konstantem k auch konstant sein, und ändert sich in gleichem Sinne wie dieses.

hindert das Auftreten eines konstanten Endzustandes. Wenn wir von diesem Unterschiede absehen, so ergiebt sich aus den Tabellen eine vollständige Analogie in den quantitativen Verhältnissen der Wirkung des Staphylolysins mit dem verschiedener Fermente.

Barth*) findet für die Einwirkung von Invertin auf 100 ccm 5 proz. Rohrzuckerlösung folgende Werte:

Invertinmenge in Gramm	Invertzucker in Gramm	
0,001	0,03	Dauer des Versuchs 30 Minuten, Temperatur des Versuchs 40° C.
0,0025	0,05	
0,005	0,10	

Barth fand also Zunahme der Wirkung des Ferments mit der Gröfse der Dosis, aber nicht proportional derselben, sondern mit der Zunahme der Dosis fallende Wirkung pro Fermenteinheit.

Tamman**) fand für die Einwirkung von Emulsin auf Salicin folgende Werte:

Emulsinmenge in mg	Menge des gespaltenen Salicins in Prozenten des ursprünglich vorhanden gewesenen (3,0069 g)	
3,9	11,7	Dauer des Versuchs 24 Stunden, Temperatur des Versuchs 0°
7,8	17,9	
11,7	27,2	
15,6	32,6	
31,2	46,4	
62,5	51,8	
125	66,0	
250	66,0	
500	66,0	

Ein ähnliches Ergebnis hatte ein Versuch Tammans bezüglich der Wirkung des Emulsins auf Arbutin.

Emulsinmenge in mg	Zersetztes Arbutin in Prozenten	
7,8	41,3	Ursprüngliche Arbutinmenge = 100 ccm 4 proz. Lösung Dauer des Versuchs 18 Stunden.
15,6	41,7	
31,2	42,6	
62,5	44,3	

*) Berliner Berichte 1878, S. 481.
**) Zeitschrift f. physiol. Chemie 16.

Tamman fand also in beiden Versuchen Zunahme der Wirkung mit wachsenden Fermentmengen. Doch war diese nicht proportional den Fermentmengen, sondern sank mit wachsenden Fermentmengen.

Dasselbe Ergebnis brachte eine genaue Überprüfung der Barthschen Angabe über die Wirkung des Invertins auf Rohrzucker durch Tamman.

Für die Wirkungsweise des Pepsins beweist die Gültigkeit der Schützschen Regel*) ähnliche quantitative Verhältnisse.

Über die Einwirkung konstanter Fermentmengen auf wechselnde Mengen spaltbaren Stoffes berichten verschiedene Autoren.

Barth fand bei Einwirkung von 5 mg Invertin auf 100 ccm von Rohrzuckerlösungen verschiedener Konzentration folgende Werte:

Konz. der Rohrzuckerlösung in Prozenten	Gebildete Menge Invertzucker in Gramm	Menge des gebildeten Invertzuckers pro 1 mg Rohrzucker	
0,5	20	40	Dauer des Versuchs ½ Stunde Temperatur des Versuchs 40° C.
1,0	43	43	
2,5	65	26	
5,0	100	20	
7,5	100	13	
10,0	104	10	
15,0	104	7	
20,0	83	4	

Ein ähnliches Resultat gaben die Versuche von Marckwort und Hüfner über die Einwirkung von Emulsin auf Amygdalin.

Tamman findet für letztere folgende Werte bei wechselnder Versuchsdauer, wechselnden Amygdalinmengen und konstanten Emulsinmengen.

Menge des Amygdalins in Grammen	Zersetzte Amygdalinmengen in Grammen nach					
	4	8—10	13—15	18—19	23—24	Min. **)
2,555	0,13	0,29	0,57	0,76	0,79	
5,110	0,09	0,36	0,61	0,85	1,01	
10,22	0,02		0,54	0,73	0,89	

Es ergiebt sich mithin für das Invertin und für das Amygdalin ganz genau dasselbe Gesetz wie für das Staphylolysin, nämlich

*) Emil Schütz, Zeitschrift f. physiol. Chemie 9.
Julius Schütz, Zeitschrift f. physiol. Chemie 30.

**) Bei Tamman fehlt diese präzise Zeitangabe, doch folgt aus anderen Versuchen zweifellos, dafs es sich um Minuten handelt.

Wachsen der absoluten Menge der durch gleiche Fermentmengen aus wachsenden Substanzmengen zersetzten Substanz und Abnahme ihrer relativen Menge.

Dieses im allgemeinen gültige Gesetz zeigt dieselbe Einschränkung, die wir bei der Einwirkung des Staphylolysins für dieses zeigen konnten. Die Zunahme der absoluten Menge der zersetzten Substanz mit der Zunahme der reagierenden Substanz zeigt sich nur bis zu einer gewissen Grenze. Oberhalb dieser fällt die absolute Menge der zersetzten Substanz mit der Zunahme der der Fermentwirkung unterworfenen Menge. Der Versuch von Tamman zeigt, daſs die Analogie der Lysinwirkung mit einer Fermentwirkung noch weiter geht. Wir sehen, daſs nach ganz kurzer Zeit (4 Minuten) die Werte der zersetzten Amygdalinmengen mit der Zunahme der Amygdalinquantität stark fallen, während sich nach etwas längerer Versuchsdauer für die Werte 2,555 und 5,110 das Verhältnis wieder umkehrt. Wir sehen also hier beim Emulsin, ebenso wie früher beim Staphylolysin eine Verschiebung des Grenzwertes, oberhalb dessen der absolute Wirkungswert des Ferments mit der Substanzmenge abnimmt, durch die verschiedene Dauer des Versuches.

Dasselbe Verhalten zeigt Tamman in einem weiteren Versuche vom Invertin. In diesem prägt sich die Abnahme der absoluten Menge des gespaltenen Zuckers mit der Zunahme der zum Versuche verwendeten Rohrzuckermenge bei kurzer Versuchsdauer so stark aus, daſs man in diesen Versuchen ein „Inkubationsstadium“ von 1 Stunde konstatieren kann.

Die bezüglichen Zahlen sind folgende:

20 ccm 1 proz. Rohrzuckerlösung geben nach 60 Minuten 14, nach 600 Minuten 26, nach 1500 Minuten 54,

20 ccm 5 proz. Rohrzuckerlösung geben nach 60 Minuten 0, nach 600 Minuten 78, nach 1500 Minuten 262,

20 ccm 10 proz. Rohrzuckerlösung geben nach 60 Minuten 0, nach 600 Minuten 160, nach 1500 Minuten 439

bei Einwirkung gleicher Invertinmengen. Die unbenannten Zahlen bedeuten Abnahme des Drehungswinkels in Minuten im 22 cm langen Rohr.

Berechtigen schon diese Versuche und Überlegungen zu der Behauptung, daſs das Staphylolysin als Ferment wirkt, so möchte ich doch noch auf einen weiteren Umstand aufmerksam machen, der die Fermentnatur des Staphylolysins zu stützen geeignet ist, weil er einiges theoretisches Interesse bietet.

Ostwald definiert die Wirkung eines Katalysators als Beschleunigung eines spontan vor sich gehenden Vorgangs. Es erscheint mir nun interessant, dafs ich in Bestätigung älterer Versuche oben zeigen konnte, dafs die Hämolyse auch spontan vor sich geht.

Wir dürfen somit die Wirkung des Staphylolysins als katalytisch hervorgerufene Beschleunigung der spontanen Hämolyse auffassen.

Diese Auffassung findet auch in Einzelheiten ihre Stütze. Wir sehen z. B. die Spontanhämolyse nach einer lange dauernden Inkubation mit einer langsam zunehmenden, später wieder abfallenden Beschleunigung ansteigen. Betrachten wir im Vergleich zu diesem Vorgang die durch wechselnde Lysinmengen hervorgerufenen Veränderungen, so sehen wir, wenn wir von der Wirkung kleiner zu der grofser Dosen übergehen, eine allmähliche Verkürzung jedes einzelnen Teiles der Kurve eintreten. Die Inkubationsfrist wird kürzer, die Beschleunigung des Anstieges wächst schneller u. s. w.

Ich glaube deshalb berechtigt zu sein, das Staphylolysin einfach als ein hämolytisches Ferment zu bezeichnen.

Diese Auffassung der Wirkungsweise eines Toxins ist übrigens nichts Neues. Schon Roux hat die Analogie zwischen fermentativer und Toxinwirkung betont. Buchner*) hielt die Alexine für proteolytische Fermente. Morgenroth**) bringt Enzyme und Toxine in so nahe Beziehung zu einander, dafs er für beide einen ganz analogen Bau vermutet. Morgenroth konnte für das Labenzym auch einen Antikörper durch Immunisierung gewinnen. Dasselbe gelang schon früher Gessard***) für die Tyrosinase. Hahn†) fand im normalen Serum Antitrypsin und Antipepsin. Landsteiner††) konnte zeigen, dafs sich im Serum verschiedener Tiere die allerverschiedensten spezifischen Antienzyme finden. Sachs†††) gelang es, ein Immun-Antipepsin zu gewinnen. In jüngster Zeit vertritt besonders Oppenheimer in seiner Monographie über die Fermente in geistvoller Weise die Lehre von der Analogie der Wirkungsweise der Fermente und der Toxine.

Betreffs der Hämolysine hat, wie oben bemerkt, Buchner die Ansicht vertreten, dafs die hämolytischen Alexine als proteo-

*) Münchener med. Wochenschr. 1899, No. 39 und 40, und 1900, No. 9.
**) Centralblatt für Bakteriologie 26 und 27.
***) Annales de l'Institut Pasteur 1901.
†) Berliner klin. Wochenschrift 1897.
††) Centralblatt für Bakteriologie 27.
†††) Fortschritte der Medizin 1902.

lytische Enzyme aufzufassen sind. Nolf konnte nun wohl mit Sicherheit zeigen, dafs es sich bei den Hämolysinen des Serums um proteolytische Fermente nicht handeln könne, da er die Produkte einer Proteolyse nicht nachweisen konnte. Nolf wendet sich überhaupt gegen die Auffassung der Hämolysine als Fermente hauptsächlich aus dem Grunde, weil er bei seinen Versuchen keine Spaltungsprodukte nachweisen konnte. In dem Momente, wo wir das Auftreten der Blutkörperchenlösung als Folge einer Spaltung einer komplexeren Verbindung auffassen, verschwindet für uns der Grund Nolfs gegen die hier vertretene Auffassung, die wohl als direktes Ergebnis unserer quantitativen Untersuchungen bezeichnet werden kann.

Auf die Analogie, die sich zwischen der Wirkungsweise des Staphylolysins und den von Bordet und Ehrlich für Immunhämolysin aufgestellten, von Eisenberg und Volk erst kürzlich für die Agglutinine genauer studierten eigentümlichen Bindungsgesetzen nachweisen läfst, konnte hier nicht näher eingegangen werden, da das Studium der Relation zwischen Bindung und lytischer Wirkung des Staphylolysins Gegenstand einer weiteren Arbeit sein soll.

5. Quantitative Auswertung des Staphylolysins.

Wenn wir die Wirkungsweise des Staphylolysins betrachten, so sehen wir leicht, dafs uns verschiedene Methoden offen stehen, die Wirksamkeit eines Lysins zu messen. Da seine Wirkung sich als gröfsere oder geringere Beschleunigung äufsert, so wäre der einfachste Weg der, zu bestimmen, in welcher Zeit aus einer bestimmten Blutmenge durch eine bestimmte Menge Lysin eine bestimmte Hämoglobinmenge gelöst wird. Einen Spezialfall dieser Bestimmungsmethode böte die zeitliche Bestimmung des Eintritts der vollständigen Lyse. Man müfste selbstverständlich zu diesen Versuchen immer dieselben Blutmengen in derselben Kochsalzlösung verwenden, da die Gröfse der Lösung durchaus nicht einfach von dem relativen Quotienten $\frac{\text{Lysin}}{\text{Blutmenge}}$ abhängt, sondern sich auch bei Konstanz dieser Relation für verschiedene absolute Blutmengen verschieden erweist. Es müfsten dann aus mehreren Bestimmungen Zeittabellen für verschiedene Mengen hergestellt werden. Man ersieht sofort, dafs diese Methode aufserordentlich umständlich wäre, besonders dann, wenn als Endreaktion nicht vollständige Lyse verwendet wird. Wie aus dem Folgenden zu ersehen, kann die Ver-

wendung der vollständigen Lyse als Indikator der Wirkung eine Quelle grofser Fehler sein, und es mufste infolgedessen diese Methode fallen gelassen werden.

Eine zweite Methode könnte auf die Ermittelung des innerhalb einer bestimmten Zeit aus einer bestimmten Blutmenge durch eine Toxineinheit gelösten Hämoglobins gegründet werden. Dieses Verfahren wäre an sich sehr einfach; da jedoch, wie aus den Tabellen zu ersehen ist, die Beziehungen der Lysinmenge zur gelösten Blutmenge nicht sehr einfache sind, so müfsten für diesen Zweck erst genaue Tabellen angelegt werden. Immerhin kann die Bestimmung der aus einer bestimmten Blutmenge nach einer bestimmten Zeit gelösten Hämoglobinmenge eine brauchbare Charakterisierung des Wertes eines Lysins abgeben.

Als dritte Methode könnte die Bestimmung des Optimums der Wirkung nach Zeit und Blutmenge Verwendung finden. Auch für diese Bestimmung müfsten erst Tabellen angefertigt werden.

Ein viertes Verfahren ergäbe sich aus der Ermittelung der Menge Lysin, die notwendig ist, um in einer bestimmten Zeit aus einer bestimmten Blutmenge eine bestimmte Hämoglobinmenge in Lösung zu bringen. Ein spezieller Fall dieser Bestimmungsmethode wäre die Bestimmung der Menge Lysin, die notwendig ist, um vollständige Lyse hervorzurufen. Ich würde diese Methode am meisten befürworten. Es sind für sie keine Tabellen notwendig. Die Vergleichung des Wirkungswertes zweier Lysine ergiebt sich sofort aus der Vergleichung der zu einer bestimmten Wirkung notwendigen Tropfenanzahl. Ehrlich verwendet für seine Untersuchungen den Spezialfall der vollständigen Lyse. Ich habe schon oben hervorgehoben, dafs die Verwendung der vollständigen Lyse als Indikator der Kraft eines Lysins leicht zu Täuschungen führen kann. Aus den Tabellen ersehen wir, dafs die Menge des aus einer bestimmten Blutmenge durch wechselnde Lysinmengen gelösten Hämoglobins pro Toxineinheit immer kleiner wird, je näher wir der vollständigen Lyse kommen. Es ergiebt sich daraus, dafs sich bei dieser Lösungsgrenze die Wirkungen verschiedener Lysinmengen nur wenig mehr voneinander unterscheiden. Da nun die Lösung des Blutes niemals so vollständig ist, dafs in der Flüssigkeit auch nicht eine kleine Trübung wahrnehmbar wäre, da doch zum mindesten die Stromata immer ungelöst bleiben, so ergiebt sich, dafs eine halbwegs scharfe Einstellung unmöglich ist, ganz abgesehen davon, dafs man bei gröfseren Blutmengen vollständige Lyse überhaupt nicht erzielen kann.

Aus den Tabellen ergiebt sich, dafs der Wirkungswert eines Toxins pro Einheit bis zu einer gewissen Grenze mit fallendem Quotienten $\frac{\text{Lysinmenge}}{\text{Blutmenge}}$ wächst, sonach auch der Unterschied in der Wirkung verschiedener Lysinmengen um so gröfser wird, je kleiner dieser Quotient ist. Es ist mithin am vorteilhaftesten, den Wirkungswert eines Lysins bei möglichst kleinem Quotienten $\frac{\text{Lysinmenge}}{\text{Blutmenge}}$, d. h. in dem Optimum seiner Wirkungskraft zu bestimmen. In unsern Fällen zeigte sich dieses Optimum bei 24stündiger Einwirkung meist bei einem Quotienten $^1/_{40}$ bis $^1/_{10}$. Diese Zahlen gelten natürlich nur für die untersuchten Lysine, da sie vom Wirkungswert des Lysins abhängen. Allgemeinere Gültigkeit dürfte vielleicht unser Erfahrungsgesetz beanspruchen, wenn wir es in folgender Form ausdrücken: Die Gröfsendifferenzen und Wirkungswerte verschiedener Lysinmengen zeigen sich bei jenen Versuchen, bei denen die Mengen des gelösten Hämoglobins etwa $^1/_6$ bis $^1/_{12}$ der der Lysinwirkung unterworfenen Blutmenge bedeuten. Von sehr wesentlicher Bedeutung für derartige quantitative Untersuchungen ist die Berücksichtigung der Einwirkungszeit. Aus den Tabellen ist ersichtlich, dafs die Unterschiede in den Mengen des gelösten Hämoglobins bei verschiedenen Toxinmengen um so kleiner werden, je gröfser die Dauer der Einwirkung ist. Es ergiebt sich hieraus für quantitative Untersuchungen die Lehre, bei möglichst kurzer Versuchszeit zu arbeiten. Eine untere Grenze hat aber dieses Gesetz auch, da sich für kleine Dosen Toxin eine längere Inkubationsfrist nachweisen läfst, resp. ein längerer Zeitraum, innerhalb dessen der Wirkungswert der Toxineinheit sehr klein ist. Es ergäbe sich daher, dafs, wenn zur Wertbestimmung relativ kleine Dosen Toxin verwendet werden, die Dauer der Einwirkung länger werden mufs. In der oben angegebenen Methode ist übrigens dieser Punkt schon berücksichtigt, da es nur darauf ankommt, dafs innerhalb der Versuchszeit sich ein möglichst grofser Wirkungswert der Toxineinheit zeigt. Für die Untersuchung nach 24 Stunden gilt das oben Gesagte. Bei kürzerer oder längerer Versuchsdauer müfsten gröfsere resp. kleinere Toxinmengen verwendet werden, um das Optimum der Wirkung zu erreichen. Für sehr kleine Toxinmengen läfst sich eine Wertbestimmung nicht durchführen, weil bei der dann nötigen längeren Versuchsdauer die Autolyse stören würde.

Aus allen diesen Auseinandersetzungen ergiebt sich als bestes Verfahren für quantitative Lysinauswertungen folgendes mit jener

Methode, die **Madsen**, freilich auf Grund anderer theoretischer Überlegungen, für das Tetanolysin in seinen Arbeiten angewendet hat, im wesentlichen identisches Vorgehen. Der Wert eines Lysins im Vergleich zu einem andern ergiebt sich aus der Zahl der Tropfen dieses Lysins, die aus einer gemessenen, in einer bestimmten Anzahl Kubikzentimeter 0,85 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmten Blutmenge innerhalb einer bestimmten Zeit eine bestimmte Hämoglobinmenge zu lösen im stande sind. Dabei ist der Versuch so anzustellen, dafs die Menge des gelösten Hämoglobins etwa $^1/_6$ bis $^1/_{12}$ der zur Verfügung gestellten Blutmenge entspricht. Man könnte auf diese Weise auch zu einer absoluten Wertbestimmung gelangen, wenn man z. B. dasjenige Lysin, von dem ein Tropfen auf zehn Tropfen Blut in 5 ccm Kochsalzlösung 100 **Fleischl** ergiebt, als Einheit nehmen und jenes Lysin, von dem $^1/_2$, 2, 3 .... u. s. w. Tropfen dieselbe Wirkung hatten, als 2-, $^1/_2$-, $^1/_3$- ..... u. s. w. wertig bezeichnen würde. Der Wert einer solchen absoluten Wertbestimmung der Lysinwirkung wird aber durch das wechselnde Verhalten eines und desselben Lysins gegenüber Blutkörperchen verschiedener Kaninchen stark beeinträchtigt.

Ein Beispiel einer derartigen Wertbestimmung ergiebt folgende Tabelle:

8 Tropfen Blut und x Tropfen Lysin geben für Lysin:

Lysinmengen	a	b	c	d	e	
0,1	0	0	0	0	0	0 = unbestimmbar < 10
0,5	106	43	32	30	30	
1,0	187	128	100	80	70	
2,0	330	205	195	182	130	

2 Tr. Toxin b wirken stärker als 1 Tr. a} $\frac{1}{2}$ $a < b < a$
1 „ „ a wirkt „ „ 1 „ b}

2 „ „ c wirken „ „ 1 „ a} $\frac{1}{2}$ $a < c < b$
2 „ „ c „ schwächer „ 2 „ b}

2 „ „ d „ fast gleich „ 1 „ a $d = \frac{1}{2} a$

2 „ „ e „ „ „ „ 1 „ b $e = \frac{1}{2} b > \frac{1}{4} a$

Die fünf zum Versuche herangezogenen Staphylolysine waren Produkte desselben Coccus in verschieden reagierender Bouillon.

a) = Staphylokokkenkultur in Bouillon vom Säuregehalt pro 100 ccm = 1,3 ccm Normalsäure,

b) = Staphylokokkenkultur in Bouillon vom Säuregehalt ($^1/_6$ alkalisch) pro 100 ccm = 1,5 ccm Normalsäure

c) = Staphylokokkenkultur in Bouillon vom Säuregehalt (neutral) pro 100 ccm = 0,

d) = Staphylokokkenkultur in Bouillon vom Alkaligehalt (alkalisch) pro 100 ccm = 0,5 ccm normal,
e) = Staphylokokkenkultur in Bouillon vom Säuregehalt (sauer) pro 100 ccm = 2,25 ccm normal.

Dieser Versuch war für mich die Veranlassung zur Bereitung des Lysins mit saurer Bouillon von 1,3 ccm Normal-Säuregehalt pro 100 ccm. Dafs die verschiedene Wirkung der einzelnen Lysine nicht von der verschiedenen Reaktion direkt abhängt, konnten wir ebenso wie Neifser und Wechsberg für ihre Lysine durch nachträgliche Reaktionsänderung feststellen. Es ergab sich daraus ebenso wie für Neifser und Wechsberg*) auch für uns der Schlufs, dafs derselbe Staphylococcus in verschieden reagierenden Bouillonproben in derselben Zeit entweder verschiedene Mengen des Lysins oder verschieden wirksames Lysin erzeugt. Welche dieser beiden Möglichkeiten zutrifft, werden uns vielleicht quantitative Bindungsversuche mit Antilysin, die wir anstellen wollen, zeigen können.

6. Wirkungen des Lysins im Organismus.

Die Frage, die mich bei der ganzen Untersuchung leitete, war die Frage nach der Wirkungsweise des Lysins im Organismus. Bevor ich noch durch vorstehende Tabellen Klarheit über die Wirkungsweise des Lysins in vitro erlangt hatte, habe ich durch das direkte Tierexperiment die Frage zu klären gesucht. Ich gebe die bei diesen Versuchen gewonnenen Erfahrungen kurz wieder:

Bei der einfachen Blutuntersuchung mit Staphylolysin vergifteter Tiere war mir einigemal aufgefallen, dafs die Zahl der roten Blutkörperchen stärker abgenommen hatte, als die Fleischlzahl. Bei der Zählung der roten Blutkörperchen war als Verdünnungsflüssigkeit 0,85 proz. Kochsalzlösung verwendet worden. Kontrollzählungen mit Hayems Zählflüssigkeit ergaben höhere Werte. Es war daraus klar, dafs für die Blutkörperchen die 0,85 proz. Kochsalzlösung nicht indifferent war. Entsprechend dem in den einleitenden Worten ausgesprochenen Gedankengange dachte ich mir nun, dafs die roten Blutkörperchen geschädigt seien, ihre Resistenz gegen Kochsalzlösung vermindert sein müsse. Die Resistenzverminderung suchte ich nun dadurch festzustellen, dafs ich das Verhalten des Blutes verschiedenen Kochsalzlösungen gegenüber untersuchte. Die Untersuchungsmethode war folgende: Es wurden mittels Melangeurs 2 proz. Blutmischungen mit Kochsalzlösungen verschiedenen Gehaltes hergestellt (5, 6, 7, 8, 8,5, 9, 10 pro Mille) und diese dann in kleinen Gefäfschen centrifugiert. Das Resultat aller dieser Untersuchungen war, dafs sich in den meisten

*) Zeitschrift für Hygiene 1901, 36, 3. Heft.

Fällen kein Unterschied in dem Verhalten des kranken Blutes gegenüber dem gesunden Blut konstatieren liefs. Die Verhinderung der Blutlösung war meist bei 0,6 Proz. erreicht; 0,7 proz. Lösung konservierte immer, hie und da aber auch 0,5 proz. Lösung. Nur selten zeigte sich bei kranken Tieren auch in den höher prozentigen (über 6 Prom.) Kochsalzlösungen Blutlösung. Diese Lösung zeigte jedoch keine graduelle Steigerung in Kochsalzlösungen von fallendem Kochsalzgehalt; es war in diesen Fällen meist in allen Röhrchen ganz gleiche Lösung. Hie und da war die Lösung auch in dem einen oder anderen Röhrchen stärker. Es liefs sich jedoch absolut keine Beziehung zwischen dem Prozentgehalt der Kochsalzlösung und ihrer Lösungsfähigkeit gegenüber den Blutkörperchen herstellen.

Es ergab sich aus diesen Versuchen, dafs wohl hie und da eine Schädigung der roten Blutkörperchen konstatiert werden konnte, dafs diese jedoch nicht in einer Änderung des osmotischen Verhaltens bestand.

Alle übrigen Versuche, die Herabsetzung der Resistenz der roten Blutkörperchen auf andere Weise zu ermitteln, schlugen fehl. Ich gab deshalb dieses Verfahren nach mehrfachen Bemühungen wieder auf.

Ein ebenso negatives Resultat hatte die Untersuchung auf Hämoglobinämie. Ich konnte eine solche bei meinen mit Staphylolysin vergifteten Kaninchen niemals konstatieren.

Auf Grund der theoretischen Vorstellungen über die Wirkungen des Staphylolysins gelangte ich dann zu einer neuen Vermutung. Die relativ kleinen Mengen Staphylolysin, die im Organismus zur Wirkung gelangten, hatten in vitro erst nach einigen Tagen zu einer beträchtlicheren Lyse geführt. Ich konnte mir nun vorstellen, dafs auch im Organismus die Lyse nur langsam vor sich geht. Diese geringe Menge gelösten Hämoglobins konnte nun in der Leber zu Gallenfarbstoff umgewandelt werden, so dafs niemals nachweisbare Hämoglobinämie entstand.

War diese Vorstellung richtig, so mufste das Blut, wenn es den Tieren entnommen wurde, weitere Lösungserscheinungen zeigen.

Diese Vermutung erwies sich als richtig, und es konnte öfters in dem in Kochsalzlösung aufgeschwemmten Blut, in dem sofort nach dem Centrifugieren keine Hämolyse nachzuweisen war, nach 24- bis 48 stündigem Stehen im Brutofen schon deutliche Hämolyse nachgewiesen werden *).

*) Der Nachweis von Lysinen in dem Blut mit Lysinen vergifteter Tiere wurde schon oft versucht, diese Versuche mufsten aber meiner Ansicht nach deshalb immer ein negatives Resultat haben, weil das Lysin im Serum gesucht wurde, während es doch selbstverständlich den Blutkörperchen anhaften mufs. An diesen verursacht es dann in vitro die in der Tabelle verzeichneten Veränderungen.



3 Kaninchen von etwa 1 kg Gewicht wurden je 0,5 ccm eines Lysins injiziert, von dem 0,2 Tropfen aus 8 Tropfen Blut in 24 Stunden Hämoglobin im Werte von 395 Fleischl zu lösen vermochte; die Tiere nach 1, 2 und 4 Tagen entblutet. Von den drei verschiedenen Blutsorten wurden sterile Blutaufschwemmungen von 8 Tropfen in 5 ccm 0,85 proz. Kochsalzlösung hergestellt und im Brutofen einer Temperatur von 30° ausgesetzt. Es zeigte sich gegenüber dem Kontrollblute eines gesunden Kaninchens in dem Röhrchen vom 2. Tage deutliche Lyse, während die übrigen Röhrchen sich ebenso verhielten wie das Kontrollröhrchen.

Das Verhalten des Blutes vom 2. Tage giebt folgende Tabelle wieder:

8 Tropfen Blut in 0,85 proz. Kochsalzlösung geben bei Brutofentemperatur beim kranken Tier:

sofort	nach 1 Tag	nach 2 Tagen	nach 3 Tagen
0	0	140 fast vollständige Agglutination	365 vollständige Agglutination
im Kontrollröhrchen			
0	0	50 keine Agglutination	227 unvollständige Agglutination

Ein ähnliches Resultat hatten weitere Versuche, die ich hier nicht anführe, weil sie als Gegenstand einer weiteren Arbeit in ausführlicher Weise besprochen werden sollen.

Ganz dieselbe Erscheinung zeigte das Blut eines Hundes, dem subkutan 1 ccm Immunhämolysin injiziert worden war. Da dieses viel stärker hämolytisch wirkte als mein Staphylolysin, zeigte sich sehr bald Hämoglobinämie und Hämoglobinurie.

Eine Blutprobe: 8 Tr. in 1,0 proz. Kochsalzlösung, zeigte
nach sofortigem Centrifugieren Fleischl . . 275
nach 24 Stunden bei Zimmertemperatur . . . 400
„ 24 „ „ Brutofentemperatur . . 500
also deutliche Zeichen von Nachlösung.

Dieses eigentümliche Symptom hat neben seiner theoretischen auch praktische Bedeutung, da es wahrscheinlich ist, dafs man durch dasselbe bei Infektionskrankheiten Intoxikation mit hämolytischen von solchen mit nicht hämolytischen Giften wird unterscheiden können.

Sollte es auch noch gelingen, die Nachlösung durch Antikörper spezifisch zu hemmen, so wäre in diesem Verhalten des Blutes ein Mittel zur ätiologischen Diagnostik gegeben. Ich bin derzeit mit Versuchen dieser Art beschäftigt und werde über ihre Resultate seinerzeit berichten. Die Resultate von Madsen über die Wirkung von Antitetanolysin auf schon im Gange befindliche Lyse berechtigen zu der Hoffnung, dafs die Versuche positiv ausfallen werden.

Noch eines Nebenbefundes möchte ich Erwähnung thun, weil

er theoretisches Interesse beanspruchen und vielleicht in den Dienst der ätiologischen Diagnostik gestellt werden kann.

Kraus und Ludwig zeigten in ihrer mehrfach citierten Arbeit das Auftreten von Anämie und von kernhaltigen roten Blutkörperchen im Blute nach Injektionen von Bakteriohämolysinen; bei den Nachuntersuchungen, die ich für diese Arbeit machen mufste, fiel mir einigemal auf, dafs kernhaltige rote Blutkörperchen sich im Blute fanden, bevor noch Anämie konstatiert werden konnte. Es spricht dieser Befund dafür, dafs beides, Anämie und Auftreten von kernhaltigen roten Blutkörperchen, direkt auf die Wirkung des Lysins bezogen werden können. Es wäre diese Auffassung vielleicht für das schubweise Auftreten von Normoblasten im Blute Chlorotischer sowie für ihr Auftreten bei Leukämie zu verwerten*). Jedenfalls spricht das Auftreten von kernhaltigen roten Blutkörperchen schon nach der Arbeit von Kraus und Ludwig für eine Hämolysinintoxikation, und das um so mehr, wenn eine stärkere Anämie, die ihr Auftreten verständlich machen würde, fehlt.

Aus vorliegender Arbeit ergeben sich folgende Schlufssätze:

1. Das Staphylolysin wirkt sowohl innerhalb als auch aufserhalb des Organismus wie ein Ferment.

2. Die Wirksamkeit des Staphylolysins wächst bei Versuchen in vitro stetig mit der Zeit. Beim Tierversuche zeigt sich für diese Wirksamkeit eine Grenze. Dieses Verhalten ist der Ausdruck der Ausscheidung resp. der Kompensation des Giftes.

3. In einigen Tierversuchen mit einem anderen Lysin (Immunhämolysin) ergiebt sich auch für dieses mit grofser Wahrscheinlichkeit eine fermentale Wirksamkeit.

4. Es giebt eine aseptische spontane Hämolyse.

5. Intoxikation mit einem Lysin (Staphylolysin resp. Immunhämolysin) kann im Blut folgende Symptome verursachen:

a) Oligocythämie (das folgt aus der Arbeit von Kraus und Ludwig).

b) Rascheren Eintritt der Spontanhämolyse und Spontanagglutination (Kaninchenblut).

c) Öfteres Auftreten von kernhaltigen roten Blutkörperchen im Blut, bevor noch Anämie aufgetreten ist.

*) Ein Analogon dieses Auftretens von kernhaltigen roten Blutkörperchen im Blute ohne gleichzeitige Anämie ist die von Cantacuzène beobachtete Thatsache, dass Injektionen von kleinen Dosen eines Lysins Polycytaemia rubra hervorriefen.



V.

Über das Verhalten der Albumosen in der Darmwand und über das Vorkommen von Albumosen im Blute.

Von Dr. **Gustav Embden**

(z. Z. Assistent am königl. Institut für experimentelle Therapie in Frankfurt)

und

Dr. **Franz Knoop.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Durch den Nachweis, dafs das in der Magenschleimhaut konstant vorkommende „Pepton" *) (im älteren Sinne) beim Liegen des herausgeschnittenen Magens eine auffällige Abnahme erfährt**) ***), und durch weitere Untersuchungen wurde Hofmeister zu der Anschauung geführt, dafs innerhalb der Magenschleimhaut eine Regeneration von „Pepton" zu koagulablem Eiweifs stattfindet.

Diese Anschauung, die später von Hofmeister auch auf den Darm übertragen wurde†), fand eine wesentliche Stütze in den Untersuchungen Glässners ††). Glässner stellte fest, dafs die in der Magenschleimhaut vorhandenen Albumosen zur Zeit der Eiweifsverdauung beim Liegen der isolierten Schleimhaut zum grofsen Teile verschwinden und dafs an die Stelle derselben

---

*) Überall, wo im Folgenden das Wort „Pepton" (in Anführungszeichen) angewandt wird, ist es im älteren Sinne (nicht im Sinne Kühnes) gebraucht.

**) F. Hofmeister, Zur Lehre vom Pepton IV. Über die Verbreitung des Peptons im Tierkörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie Bd. VI, S. 51 (1882).

***) Derselbe, Zur Lehre vom Pepton V. Das Verhalten des Peptons in der Magenschleimhaut. Ebenda Bd. VI, S. 69 (1882).

†) Derselbe. Untersuchungen über Resorption und Assimilation der Nährstoffe. Arch. f. experim. Pathol. und Pharmakol. 19, 1 (1885).

††) K. Glässner, Über die Umwandlung der Albumosen durch die Magenschleimhaut. Beitr. zur chem. Physiol. und Pathol. 1, 328 (1901).

koagulable Eiweifskörper treten. Über die Natur dieser koagulablen Eiweifskörper spricht Glässner sich nicht aus, doch hält er es für ausgemacht, dafs es sich bei der Umwandlung der Albumosen um einen regenerativen Prozefs handelt. Während Glässner seine Versuche am Magen anstellte, beziehen sich ähnliche annähernd gleichzeitig von Cohnheim ausgeführte Untersuchungen auf den Darm *), zunächst auf den von Säugetieren. Cohnheim griff auf eine von Neumeister herrührende Versuchsanordnung **) zurück. Er brachte Darmstückchen von eben getöteten Hunden und Katzen in peptonversetztes verdünntes Blut oder peptonhaltige Ringersche Lösung und stellte fest, dafs nach kurz dauernder Digestion derartiger Flüssigkeiten bei Körpertemperatur die Biuretreaktion gebenden Substanzen aus den enteiweifsten Filtraten völlig oder nahezu völlig verschwanden. Er zeigte, dafs dieses Verschwinden der Peptone durch eine Umwandlung derselben in die gewöhnlichen Endprodukte hydrolytischer Spaltung bedingt war. Er nahm an, dafs diese Spaltung der Peptone im wesentlichen durch ein in der Darmwand vorkommendes und von ihm Erepsin genanntes Ferment bewirkt würde. Ob das Erepsin intracellulär wirkt oder in das Darmlumen secerniert wird, läfst Cohnheim dahingestellt.

In jüngster Zeit haben aber Kutscher und Seemann ***) in einwandsfreier Weise dargethan, dafs die Darmwand in der That ein proteolytisches Ferment secerniert, welches „schwach Fibrin, etwas stärker Deuteroalbumoselösung zersetzt“. Diese Wirkung auf Albumosen und überdies auf Pepton wurde auch von Salaskin †) beobachtet.

Salaskin, namentlich aber Kutscher und Seemann stellten fest, dafs die Wirkung des im Darmsaft enthaltenen Fermentes eine ziemlich geringfügige ist. Letztere Autoren halten daher das von ihnen in Übereinstimmung mit Kühne beobachtete Auftreten

---

*) O. Cohnheim, Die Umwandlung des Eiweifs durch die Darmwand. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 451 (1901).

Derselbe, Weitere Mitteilungen über das Erepsin. Ebenda 35, 134 (1902).

**) R. Neumeister, Zur Physiologie der Eiweifsresorption und zur Lehre von den Peptonen. Zeitschr. f. Biologie 27, 309 (1890).

***) F. Kutscher und J. Seemann, Zur Kenntnis der Verdauungsvorgänge im Dünndarm, II. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 432 (1902).

†) S. Salaskin, Über das Vorkommen des Albumosen resp. Pepton spaltenden Fermentes (Erepsin von Cohnheim) in reinem Darmsafte von Hunden. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 419 (1902).

nicht unerheblicher Mengen von Tyrosin und Leucin, sowie das von ihnen entdeckte Vorkommen von Lysin und Arginin *) bei der Dünndarmverdauung im wesentlichen für eine Folge der Trypsinwirkung. Da Kutscher und Seemann die verschiedenen im Darminhalt aufgefundenen krystallinischen Spaltungsprodukte weder in der Darmwand noch im Blut nachweisen konnten, nahmen sie an, dafs dieselben bereits in der Darmwand so verändert werden, „dafs sie sich einstweilen unserem Nachweis entziehen". Nach der zweiten Arbeit von Kutscher und Seemann „scheinen sich" in der resorbierenden Darmwand „biuretfreie Extraktivstoffe zu finden, welche unter Behandlung mit siedender Säure Leucin abspalten". Dieser Befund spricht nach ihnen sehr für die Möglichkeit, „dafs das von der Darmwand resorbierte Leucin und die übrigen Spaltungsprodukte der Eiweifskörper bereits in der Darmwand eine Verkuppelung mit anderen Körpern erfahren".

Unsere eigenen Untersuchungen wurden zunächst namentlich durch den Widerspruch zwischen den von Cohnheim und von Glässner erhobenen Befunden veranlafst. Cohnheim kam auf Grund seiner Versuche am Darm zu dem Resultat, dafs „das von Hofmeister, Neumeister und Salvioli beobachtete Verschwinden der Peptone bei Berührung mit der Darmwand nicht auf ihrer Assimilation oder ihrer Restitution zu Eiweifs beruht, sondern auf ihrer weiteren Spaltung in einfachere Spaltungsprodukte". Glässner dagegen gelangte für den Magen zu dem gerade umgekehrten Ergebnis.

Von vornherein erschien es uns als möglich, dafs die abweichenden Anschauungen beider Autoren auf der Verschiedenheit ihrer Versuchsanordnung beruhte. Während Glässner sich, wie vor ihm Hofmeister, bemühte, die resorbierende Magenschleimhaut thunlichst von allen ihr aufsen anhaftenden Verunreinigungen, namentlich Eiweifsspaltungsprodukten und Fermenten, zu befreien, um so ein möglichst reines Bild von der Umwandlung der Albumosen innerhalb der „überlebenden" Magenschleimhaut (nicht bei „Berührung mit der Schleimhaut", wie sich Cohnheim ausdrückt) zu gewinnen, brachte Cohnheim in eine Peptonlösung Darmstücke, die allem Anschein nach während des Versuches ihnen aufsen anhaftendes oder von ihnen gebildetes Ferment an

*) Fr. Kutscher und J. Seemann, Zur Kenntnis der Verdauungsvorgänge im Dünndarm, I. Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 530 (1902). Daselbst siehe auch die übrige Litteratur über das Auftreten niederer Spaltungsprodukte bei der Dünndarmverdauung.



die peptonhaltige Lösung abgaben. Die von Cohnheim gewählte Neumeistersche Versuchsanordnung schien uns zwar im wesentlichen geeignet, die Wirkung von der Mucosa anhaftendem Ferment auf Peptonlösungen zu zeigen, aber völlig ungeeignet, irgend sichere Ergebnisse bezüglich des Verhaltens der „Peptone“ innerhalb der Darmwand zu liefern. Wir griffen daher bei unseren Untersuchungen am Darm ebenso wie Glässner bei den seinigen am Magen auf die Hofmeistersche Versuchsanordnung zurück. In der chemischen Methodik lehnten wir uns auf das engste an Glässner an.

Versuche am normalen Darm.

Durch diese Versuche suchten wir zunächst zu ermitteln, ob in der Darmschleimhaut, ähnlich wie in der des Magens, auf der Höhe der Eiweifsresorption eine Zunahme des koagulablen Eiweifses beim Liegen stattfindet.

Auf der Höhe der Darmresorption befindliche Hunde (5 bis $9^1/_2$ Stunden nach reichlicher Fleischfütterung) wurden durch Entbluten getötet, der Darm so rasch wie möglich herausgenommen, von anhaftendem Fett befreit, längs des Mesenterialansatzes eröffnet und nunmehr auf das gründlichste gereinigt. Zur Reinigung wandten wir anfänglich den Strahl der Wasserleitung, in allen späteren Versuchen einen scharfen Strahl körperwarmer Kochsalzlösung von 0,8 Proz. an. Ein oder mehrere Stücke des gereinigten Darms wurden mit dem Messer der Länge nach in zwei möglichst symmetrische Teile gespalten *).

Jedes der beiden zusammengehörigen Längsstücke wurde gewogen, alsdann das eine sofort in eine gemessene Menge am Rückflufskühler siedender 1 proz. Lösung von primärem Kaliumphosphat geworfen und in dieser zunächst 10 Minuten lang im Sieden erhalten. Das andere symmetrische Längsstück wurde auf verschieden lange Zeit ($^1/_2$ bis 3 Stunden) in eine feuchte Kammer gelegt, deren Temperatur auf 40° gehalten wurde. Alsdann wurde es ebenso wie das sofort verarbeitete Stück mit siedender Phosphatlösung koaguliert.

Die Weiterbehandlung der Darmstücke und der aus ihnen gewonnenen Extrakte geschah folgendermafsen: Nachdem die Flüssigkeit halbwegs abgekühlt war, wurde das koagulierte Darmstück herausgenommen, in eine Reibschale gebracht, hier zunächst mit der Schere und alsdann mit dem Pistill möglichst zerkleinert, dann unter Vermeidung jedes Verlustes in die Flüssigkeit zurückgebracht und in dieser nochmals 20 Minuten zum Sieden erhitzt, so dafs die Gesamtsiededauer $^1/_2$ Stunde nicht überschritt. Nach dem Abkühlen wurde

*) Von den Versuchen blieb das Duodenum ausgeschlossen. Die verwandten Darmstücke entstammten, soweit nicht der ganze übrige Dünndarm (für mehrere Versuche) verwendet wurde, immer dem Jejunum.



das Volumen der den Darm enthaltenden Flüssigkeit genau gemessen (in vielen Fällen wurde auch auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt) und nach mehr- bis 24stündigem Stehen ein aliquoter, gemessener Teil mit dem halben Volumen gesättigter Zinksulfatlösung, der auf 100 Tle. 0,4 Tle. konzentrierter Schwefelsäure hinzugefügt waren, versetzt. Hierbei werden nach Glässner*) der Koagulation entgangene Globinreste quantitativ ausgefällt und auch etwaige Reste anderer fällbarer Eiweifskörper entfernt**). Der Niederschlag hat sich gewöhnlich nach wenigen Stunden, manchmal erst am folgenden Tage, abgeschieden, und es gelingt nun fast immer ohne besondere Mühe, ein klares Filtrat zu gewinnen.

In einem gemessenen Teil des Filtrats wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Wir haben diese Versuche in tabellarischer Anordnung zusammengestellt (Tabelle I).

In der Kolonne 11 der Tabelle ist der Filtratstickstoffgehalt des sofort verarbeiteten Darmstückes A = 100 gesetzt und der Filtratstickstoffgehalt des nach längerem Liegen bei 40° verarbeiteten Darmstückes B unter Berücksichtigung der Gewichtsunterschiede der Darmstücke auf diesen Wert bezogen. Wie man sieht, ist bei allen 12 an 9 verschiedenen Hunden ausgeführten Versuchen der Filtratstickstoffgehalt in B gröfser als der in A. In einigen Fällen sind, wie aus den in den Kolonnen 2 bis 10 gegebenen Belegen ersichtlich, die bei den Stickstoffbestimmungen erhaltenen absoluten Unterschiede sehr erheblich, in anderen nähern sie sich der Fehlergrenze der Bestimmung oder liegen gar innerhalb derselben. Da aber alle 12 Versuche in demselben Sinne sprechen, kann es keinem Zweifel unterliegen, dafs beim Liegen des Darms eine Zunahme des nicht koagulablen Stickstoffs eintrat.

Diese Vermehrung des Filtratstickstoffs konnte selbstverständlich nur auf Kosten von ursprünglich koagulablem Eiweifs geschehen,

---

*) K. Glässner, l. c. S. 332.

**) Cohnheim hat in seiner Arbeit, Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 400, gegen die hier angewandte Methodik Glässners den Einwand erhoben, dafs sich in frischen Schleimhautauszügen das Eiweifs schwerer vollständig koagulieren lasse, als wenn nach einigen Stunden ein Teil der Eiweifskörper geronnen sei, und er fordert die Erledigung dieses Einwandes, bevor die Glässnerschen Resultate gesichert seien. Wir halten diesen Einwand nicht für stichhaltig: Die Drittelsättigung mit Zinksulfat beseitigt völlig das der Koagulation etwa entgangene Eiweifsglobin, Mucin oder Nukleoproteid. Die Resultate der Vergleichsbestimmungen in vorliegender Arbeit beweisen das um so schlagender, als die Auszüge der Darmschleimhaut bei der bisher üblichen Technik noch viel schwerer eiweifsfrei zu erhalten sind, als solche der Magenschleimhaut.

Tabelle I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Sofort verarbeitetes Darmstück A				Nach längerem Liegen bei 40° verarbeitetes Darmstück B					
Nr. des Versuchs	Gewicht des Darmstücks g	Gesamtvolumen der den Darm enthaltenden Flüssigkeit ccm	Zur N-Bestimmung verwandtes Volumen des 1/3-Zinksulfat gesättigten Filtrats ccm	Neutralisierte Menge $\frac{N}{10}$-Säure ccm	Gewicht des Darmstücks g	Dauer des Liegens bei 40°	Gesamtvolumen der den Darm enthaltenden Flüssigkeit ccm	Zur N-Bestimmung verwandtes Volumen des 1/3-Zinksulfat gesättigten Filtrats ccm	Neutralisierte Menge $\frac{N}{10}$-Säure ccm	Filtratstickstoffgehalt des Darmstücks B auf Filtratstickstoff von A = 100 bezogen
1	37,5	480	60	7,15	34,9	3 Std. — Min.	480	60	9,7	146
2	37,0	600	100	9,44	37,0	2 „ 30 „	600	100	12,2	130
3	67,5	450	50	10,30	57	2 „ 15 „	450	50	13,30	146
4	44	400	30	6,4	43	1 „ 10 „	300	22,5	6,9	110
5	46	400	30	5,9	49	— „ 30 „	400	30	6,6	105
6, I	36,5	200	30	7,5	37	1 „ 15 „	200	30	9,5	125
6, II	33	260	30	5,38	34	2 „ — „	260	30	7,15	129
7, I	22,5	180	30	5,0	26	1 „ — „	160	25	5,8	107
7, II	21	160	25	5,0	19,5	2 „ — „	220	34,4	5,0	108
8, I	71,5	270	25	8,5	68,5	1 „ 40 „	290	27,5	9,0	108
8, II	29,5	230	21,5	3,9	33	1 „ 20 „	350	43	6,9	120
9	49	325	30	6,35	48,5	1 „ 15 „	325	30	7,35	116

ein Verhalten, das zu dem von Glässner am Magen beobachteten in geradem Gegensatz steht.

Die Ursache der beobachteten Eiweifsspaltung konnte eine verschiedenartige sein; es konnte sich um Fäulniserscheinungen handeln, was allerdings für die Fälle, in denen deutliche Filtratstickstoffzunahme schon nach sehr kurzer Zeit eingetreten war, von vornherein wenig wahrscheinlich erschien; oder die Abnahme des Eiweifsstickstoffs war durch die Thätigkeit in der Darmwand vorhandener oder ihr äufserlich anhaftender Fermente bedingt.

In erster Linie glaubten wir an eine Trypsinwirkung denken zu müssen. Möglicherweise fand sogar in der überlebenden Darmwand, ebenso wie in der des Magens, eine Umwandlung von nicht koagulablen Eiweifsspaltungsprodukten in koagulierbares Eiweifs statt, dieser Prozefs wurde aber durch daneben einhergehende tryptische Spaltung verdeckt.

Wir suchten deswegen den Eintritt von Trypsin in den Darm auf operativem Wege zu verhindern und wiederholten die oben geschilderten Versuche an der trypsinfreien Darmwand.

Versuche am trypsinfreien Darm.

Zur Ausschaltung des Trypsins unterbanden und durchschnitten wir, wie das früher schon öfters geschehen ist, die Pankreasausführungsgänge.

Der Verlauf der Operation gestaltete sich etwa folgendermafsen *): Der Bauchschnitt wurde 1 bis 2 Finger breit rechts von der Linea alba angelegt; er begann unmittelbar unter dem Rippenbogen und war etwa 12 bis 15 cm lang. Nach Eröffnung des Peritoneums wurde das Duodenum hervorgeholt und das Pankreas stumpf unter möglichster Schonung der Gefäfsbrücken in seiner ganzen Länge von demselben losgelöst; es gelingt so leicht, die Pankreasgänge, deren Zahl und Lage bekanntlich variiert, aufzufinden. Die Gänge werden doppelt unterbunden und zwischen beiden Ligaturen durchschnitten.

Die Operation ist bei aseptischem Vorgehen und genügender Übung nicht sehr gefährlich. Während wir anfänglich einige Tiere verloren, starb von den letzten neun operierten Hunden keiner an den Folgen der Operation.

Meist wurden die Hunde etwa 8 Tage nach der Operation getötet. Früher die Untersuchung der Darmschleimhaut vorzunehmen, schien uns deswegen unthunlich, weil einerseits die Ge-

*) Herr Prof. Dietrich Gerhardt war so freundlich, uns die Technik der Operation vorzuführen.

fahr des Vorhandenseins von Trypsinresten im Darm naturgemäfs gröfser war, andererseits auch, weil in den ersten Tagen nach der Operation häufig Durchfälle auftreten, die dann aber später bald wieder nachlassen. Der feste Kot nimmt dann — wenigstens bei fettarmer Kost — häufig eine eigentümlich fleischmehlartige Beschaffenheit an und ist fast geruchlos. Erheblich länger als 8 bis 10 Tage nach der Operation mit der Darmuntersuchung zu warten, ist deswegen unzweckmäfsig, weil sich nach dieser Zeit neue Kommunikationen zwischen Pankreas und Darm gebildet haben können, worauf uns Herr Prof. Gerhardt aufmerksam machte.

Selbstverständlich suchten wir uns nach der Tötung des Tieres zu überzeugen, ob die Ausschaltung des Pankreas eine wirklich vollständige war. Ist die Unterbindung gelungen, so mufs nach 8 Tagen das Pankreas in allen Teilen knorpelhart sein, und es darf sich ferner natürlich anatomisch keine Kommunikation zwischen Pankreas und Darm auffinden lassen. Die Untersuchung des Darminhalts gab uns keinen Aufschlufs darüber, ob Trypsin vorhanden war oder nicht. Abgesehen davon, dafs die Darmschleimhaut ein fibrinlösendes Ferment produziert (Kutscher und Seemann), ist natürlich auch an das Vorhandensein des trypsinähnlich wirkenden, aus dem Pylorusteil des Magens und den Brunnerschen Drüsen stammenden Pseudopepsins zu denken.

In der That konnten wir in mehreren Fällen, in denen allem Anschein nach die Unterbindung der Pankreasgänge vollkommen gelungen war, im Darminhalt ein Ferment nachweisen, das eine zugesetzte Fibrinflocke über Nacht löste, sehr viel rascher also, als wir es nach den Versuchen Kutschers und Seemanns von dem proteolytischen Enzym des Dünndarms annehmen dürfen.

Die Darmversuche wurden ganz in der früher beschriebenen Weise ausgeführt. Die erhaltenen Zahlen sind in Tabelle II zusammengestellt.

Auch hier ist in der Kolonne 11 der Filtratstickstoff von A = 100 gesetzt und der Filtratstickstoffwert von B darauf bezogen.

Wir sehen bei der Betrachtung dieser Zahlen vorläufig von jenen Versuchen ab, bei denen das Darmstück B länger als 2 Stunden bei 40° liegen blieb (22,III und 12,IV).

Wir bemerken alsdann, dafs auch in dieser Versuchsreihe die Zahlen für B von denen für A abweichen. Während aber bei den trypsinhaltigen Därmen diese Abweichungen ausnahmslos in einer Zunahme des Filtratstickstoffs bei B bestanden, sehen wir hier, dafs die Differenzen bald in der Richtung einer Zunahme, bald in

Tabelle II.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	Sofort verarbeitetes Darmstück A				Nach längerem Liegen bei 40° verarbeitetes Darmstück B					
Nr. des Versuchs	Gewicht des Darmstücks g	Gesamtvolumen der den Darm enthaltenden Flüssigkeit ccm	Zur N-Bestimmung verwandtes Volumen des $^1/_3$-Zinksulfat gesättigten Filtrates ccm	Neutralisierte Menge $\frac{N}{10}$-Säure ccm	Gewicht des Darmstücks g	Dauer des Liegens bei 40°	Gesamtvolumen der den Darm enthaltenden Flüssigkeit ccm	Zur N-Bestimmung verwandtes Volumen des $^1/_3$-Zinksulfat gesättigten Filtrates ccm	Neutralisierte Menge $\frac{N}{10}$-Säure ccm	Filtratstickstoffgehalt des Darmstücks B auf Filtratstickstoff von A = 100 bezogen
10, I	20,5	325	30	3,45	24,7	1 Std.	325	30	3,35	81
10, II	23,5	300	30	3,0	23,5	2 „	300	30	3,1	103
11, I	33,5	260	30	5,10	31,5	1 „	260	30	5,40	111
11, II	22,0	330	41,3	4,1	22,0	2 „	285	35,6	4,35	106
12, I	17,5	250	30	4,25	17,0	1 „	250	30	4,00	97
12, II	30,5	400	33,3	4,7	29,5	2 „	310	51,7	9,5	104
12, III	33,5	180	30	9,0	32,5	3 „	290	48,4	10,35	[118]
12, IV	21,0	250	30	4,55	21,0	4 „	250	30	8,6	[189]
13, I	37,5	150	15,5	5,8	39,5	1 „	153	15,5	6,1	102
14, I	31,5	250	41	6,0	36	1 „	196	26	6,15	110
14, II	36,5	Unbekannt, jedoch A = B.	30	8,65	38,0	2 „	—	30	8,85	98
15, I	56,5	170	20	8,9	52,5	$^3/_4$ „	170	24	10,1	102
15, II	59,5	240	25,0	8,15	56	$^5/_4$ „	270	30	9,5	116

der einer Abnahme gelegen sind. Das Mittel ist 103. Grofsenteils liegen die Abweichungen innerhalb der Fehlergrenzen der Kjeldahlbestimmung, fast ausnahmslos aber innerhalb der Fehlergrenzen, wie sie durch die gesamte Versuchsanordnung bedingt sind.

Dies geht aus besonders angestellten Kontrollversuchen hervor, bei denen wir Därme genau wie sonst der Länge nach spalteten und beide Darmstücke sofort verarbeiteten. Merklich aufserhalb dieser Fehlergrenzen liegt eigentlich nur die Abnahme des Filtratstickstoffs in Versuch 10, I und die Zunahme in Versuch 15, II.

Eine gesonderte Besprechung erfordern die Versuche 12, I bis IV, da sie den Einflufs von Fäulnis auf das Versuchsresultat zeigen. Während in den Versuchen I und II (nach ein und zwei Stunden) keine merkliche Änderung im Filtratstickstoff eingetreten ist, zeigt Versuch IV (nach vier Stunden) eine Steigerung des Filtratstickstoffs auf fast den doppelten Wert. Hier war aber bereits stinkende Fäulnis eingetreten. Demgemäfs darf wohl auch die Steigerung des Filtratstickstoffwertes in III (nach drei Stunden) auf beginnende Fäulnis zurückgeführt werden.

Zwei an pankreasoperierten Tieren angestellte Versuche haben wir nicht in die Tabelle aufgenommen.

Einen, wo wir bei der Autopsie eine unzweifelhafte Kommunikation zwischen Pankreas und Darm auffinden konnten*), und einen anderen, wo nach einer Stunde der Filtratstickstoffwert von B 130 betrug. Aller Wahrscheinlichkeit nach bestand auch hier eine Kommunikation, trotzdem ihr anatomischer Nachweis nicht gelang**).

Das wesentliche Resultat dieser Versuchsreihe läfst sich demnach folgendermafsen ausdrücken:

Am trypsinfreien Darm tritt im Gegensatz zum Normaldarm beim Liegen der gereinigten Darmwand während der ersten beiden Stunden keine erkennbare Spaltung coagulabler Eiweifskörper ein; ebensowenig ist aber auch eine Zunahme der coagulierbaren Eiweifssubstanzen (im Sinne einer Regeneration) festzustellen.

Die am Normaldarm schon innerhalb der ersten beiden Stunden eintretende Eiweifsspaltung ist sonach auf die Wirkung des

*) Diesen Versuch haben wir als Versuch 9 in der Tabelle I angeführt.

**) Dieser Nachweis begegnet bei der breiten Verwachsung, die ausnahmslos nach acht Tagen zwischen Darmserosa und Pankreas eingetreten ist, aufserordentlichen Schwierigkeiten.

Trypsins zurückzuführen, das sich eben auch durch noch so gründliches Abspülen nicht vollständig entfernen läfst*).

Auch bei jenen Versuchen, welche Hofmeister zu der Annahme führten, dafs nach Analogie der beim Magen gegebenen Verhältnisse beim Liegen der resorbierenden Darmwand**) darin enthaltene nicht coagulable Biuretkörper unter Regeneration zu Eiweifs verschwinden, war die Wirkung von Trypsin nicht ausgeschlossen. Möglicherweise beruhte auch bei diesen Versuchen das Verschwinden der die Biuretreaktion gebenden Filtratkörper lediglich auf tryptischer Spaltung der von vornherein vorhandenen und der erst durch das Trypsin beim Liegen gebildeten „Peptone“.

Es ergab sich daher die Notwendigkeit, die Versuche Hofmeisters am trypsinfreien Darm zu wiederholen.

Bevor wir unsere einschlägigen Resultate mitteilen, haben wir noch kurz einige von uns am Normaldarm zur Zeit der Eiweifsresorption vorgenommene Vorversuche zu besprechen. Wir hielten eine Nachprüfung der von Hofmeister erhobenen Befunde für notwendig, weil Hofmeister selber darauf hingewiesen hat, dafs die von ihm zur Koagulation der Eiweifskörper angewandte Eisenmethode nicht völlig einwandsfreie Resultate liefert und namentlich am Darm schwierig zu handhaben ist.

Bei unseren Versuchen verfuhren wir in folgender Weise:

Die Koagulation mittels primärem Kaliumphosphat geschah ganz, wie oben geschildert, ja in den meisten Fällen wurden zur Vergleichung der Intentisät der Biuretreaktion dieselben Darmextrakte benutzt, die auch zur Kjeldahlbestimmung dienten. Es erwies sich als notwendig, vor dem Zersetzen mit Zinksulfatlösung einzuengen. Einige an Darmextrakten vorgenommene Versuche zeigten, dafs es für die Stärke des Ausfalls der Biuretreaktion gleichgültig ist, ob man bei der vom

---

*) Neuerdings haben Kutscher und Seemann (Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 434) die mit Wasser sorgfältig gereinigte Schleimhaut des Hundedünndarms (mit Ausnahme des Duodenums) der Selbstverdauung überlassen und die dabei auftretenden Spaltungsprodukte untersucht. Kutscher und Seemann führten die Entstehung dieser Spaltungsprodukte auf die Wirkung eines der Darmschleimhaut angehörigen Fermentes zurück. Auf Grund unserer Versuche läfst sich die Möglichkeit nicht von der Hand weisen, dafs bei der von Kutscher und Seemann gewählten Versuchsanordnung noch wirksames Trypsin vorhanden war, das sich, wie aus unseren Versuchen ersichtlich, auch bei gründlichstem Waschen niemals völlig beseitigen läfst. Damit ist natürlich keineswegs gesagt, dafs die von Kutscher und Seemann beobachteten Spaltungsprozesse ausschliefslich auf Trypsin zurückzuführen sind.

**) F. Hofmeister, Archiv f. exper. Pathol. und Pharm. 19, 13.

primären Kaliumphosphat herrührenden sauren, oder bei genau neutraler Reaktion eindampft. Wir haben daher von einer Neutralisation vor dem Eindampfen abgesehen: Gleichen Bruchteilen der gesamten Darmstücke A und B entsprechende Extraktmengen wurden auf dem Wasserbade eingeengt. Das eingeengte und genau auf ein bestimmtes, geringes Volumen gebrachte Filtrat wurde nun mit dem halben Volumen gesättigter saurer Zinksulfatlösung (siehe oben) versetzt; der eintretende, nicht unerhebliche Niederschlag setzte sich bald ab. Je 2 ccm des klaren, in der Regel schwach gelblichen, bisweilen aber auch völlig farblosen Filtrates wurden in gleich weite Reagensröhrchen gebracht und mit dem gleichen Volumen starker Natronlauge versetzt*). Zu den beiden Proben wurde jetzt aus einer Bürette Tropfen für Tropfen ganz schwache Kupfersulfatlösung hinzugefügt. Die Färbungen beider Flüssigkeiten wurden nach Zusatz eines jeden Tropfens miteinander verglichen.

Wir wollen auf die Versuche am Normaldarm im einzelnen nicht eingehen, sondern nur hervorheben, dafs wir im ganzen zu anderen Resultaten, als Hofmeister, gelangten.

In einigen Fällen fanden wir zwar eine mehr oder weniger deutliche Abnahme der Biuretreaktion in dem Darmstück B, in anderen Fällen (und zwar in der Mehrzahl) stellten wir aber eine — manchmal sehr deutliche — Zunahme fest. In einer Minderzahl von Fällen war ein deutlicher Unterschied überhaupt nicht zu bemerken.

Dieses Verhalten kann nicht wundernehmen. Gehen doch beim Liegen der trypsinverunreinigten Darmschleimhaut mindestens zwei, in ihrer Intensität variable Prozesse nebeneinander einher, die den Ausfall der Biuretreaktion im Filtrat im entgegengesetzten Sinne beeinflussen müssen, nämlich die Spaltung von Eiweifs in „Peptone“ und die Spaltung von „Peptonen“ in biuretfreie Produkte. Daraus folgt ohne weiteres, dafs die Versuche am trypsinhaltigen Darm nicht im stande sind, irgendwelche Aufschlüsse über das Verhalten der „Peptone“ innerhalb der lebenden Darmwand zu liefern.

Ob unsere Filtrate Peptone im engeren Sinne des Wortes enthielten, haben wir nicht untersucht. Albumosen waren jedenfalls vorhanden. Konzentrierte Salpetersäure gab in den darauf untersuchten Fällen Trübung, die beim Erwärmen verschwand, beim Erkalten wiederkehrte und im Überschufs von Salpetersäure völlig löslich war. Sättigung mit Zinksulfat rief auch in den

*) Der starke Natronlaugezusatz ist nötig, um alles Zinkhydroxyd wieder in Lösung zu bringen.

stark verdünnten Lösungen, die vor der $^1/_3$-Sättigung nicht eingeengt waren, Trübung hervor, die sich bald in eine an der Oberfläche schwimmende Fällung verwandelte.

Ein Darmextrakt, das bei genügender Einengung und nach $^1/_3$-Sättigung mit Zinksulfat gar keine Biuretreaktion lieferte, haben wir nicht beobachtet *). (Hungertiere wurden allerdings nicht untersucht.)

Wir gehen nunmehr über zur Besprechung des Verhaltens der „Peptone" beim Liegen der trypsinfreien Darmwand, in der innerhalb der ersten beiden Stunden keine Spaltung von koagulablem Eiweifs eintritt.

Die Versuche wurden ganz in derselben Weise, wie am Normaldarm, ausgeführt. Mit einer Ausnahme kamen nur Darmextrakte, in denen auch das Verhalten des Filtratstickstoffs beim Liegen der Darmwand bestimmt wurde, zur Verwendung.

Ueber die Resultate der Versuche giebt die folgende Tabelle Aufschlufs. Die Versuche tragen, soweit sie schon in Tabelle 2 angeführt wurden, dieselben Nummern wie daselbst.

Nr. des Versuchs	Dauer des Liegens des Darmstückes B vor der Verarbeitung	Biuretreaktionen von A und B
11, I	1 Stunde	gleich stark
12, I	1 Stunde	gleich stark
12, II	2 Stunden	gleich stark
13, I	1 Stunde	in B stärker als in A
13, II	2 Stunden	in B stärker als in A
14, I	1 Stunde	in B stärker als in A
14, II	2 Stunden	gleich stark
15, I	$^3/_4$ Stunden	in B eben erkennbar schwächer, als in A

Wie man sieht, war in den acht untersuchten Fällen die Biuretreaktion des enteiweifsten Filtrates von B viermal ebenso stark wie die des Filtrates von A, dreimal war sie stärker und nur einmal konnte eine (übrigens für das geübte Auge gerade eben erkennbare) Abnahme festgestellt werden **).

*) Hiermit steht eine Beobachtung von Kutscher und Seemann, welche die Extraktivstoffe der Darmschleimhaut (mit siedendem Wasser) ohne Schwierigkeit frei von Biuretreaktion gebender Substanz erhielten (Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 433), in einstweilen nicht aufgeklärtem Widerspruch.

**) Den Versuch 12, III, wo das Darmstück B drei Stunden lang bei 40° gelegen hatte, und wo ebenfalls eine Abnahme der Biuretreaktion des Fil-

Unsere Befunde sprechen also mit aller Entschiedenheit dagegen, dafs innerhalb der überlebenden Darmschleimhaut eine Umwandlung von „Peptonen", sei es im Sinne einer Regeneration zu koagulablem Eiweifs, sei es einer Spaltung in nicht mehr die Biuretreaktion gebende Produkte stattfindet.

Wodurch die mehrfach beobachtete Zunahme der Biuretreaktion beim Liegen bedingt war, entzieht sich einstweilen völlig unserer Beurteilung.

Findet also in der Darmwand weder eine Spaltung von „Peptonen" in biuretfreie Produkte, noch eine Synthese zu koagulierbarem Eiweifs statt, so müssen die „Peptone", falls sie überhaupt von der Darmwand aufgenommen werden, als solche ins Blut übergehen.

Gegen diese Annahme ist u. a. namentlich das völlige Fehlen von Albumosen und Peptonen im Blute angeführt worden, das seit den Untersuchungen Neumeisters*) wohl fast allgemein als gesicherte Thatsache angesehen worden ist.

Bezüglich der echten Peptone (und vielleicht gewisser Deuteroalbumosen) scheinen auch uns die von Neumeister gewonnenen Resultate beweisend zu sein, da sich gegen die hier angewandte Methode der Ammonsulfatfällung kein Einwand erheben läfst.

Dafs aber auch Albumosen im Blute völlig fehlen, ist durch die Neumeisterschen Versuche unserer Erachtens durchaus nicht sicher erwiesen. Die von Neumeister angewandte Methode der Koagulation des bei 50° getrockneten Blutes mit absolutem Alkohol und die nachfolgende Extraktion des Koagulates mit Wasser von 50°, sind kaum geeignet, einwandsfreie Resultate zu liefern. Das

---

trates von B sich zeigte, haben wir nicht in die Tabelle aufgenommen, da, wie bereits oben erwähnt, augenscheinlich Fäulnis eingetreten war. — In Versuch 12 injizierten wir $^3/_4$ Stunden vor der Tötung des Tieres eine gröfsere Menge gegen Wasser 24 Stunden dialysiertes, in physiologischer Kochsalzlösung gelöstes Wittepepton mittels einer Pravazspritze in das Darmlumen, um der Darmwand Gelegenheit zu möglichst reichlicher Albumosenresorption zu geben.

*) R. Neumeister, Über die Einführung der Albumosen und Peptone in den Organismus. Zeitschr. f. Biologie 24, 272 (1888).

Derselbe, Zur Frage nach dem Schicksal der Eiweifsnahrung im Organismus. Sitzungsber. der physikalisch-medicin. Gesellsch. zu Würzburg. Jahrg. 1889, S. 64.

Derselbe, Lehrbuch der physiol. Chem., Jena 1897, S. 310.

erhaltene Eiweifskoagulum hält etwa vorhandene, gleichmäfsig in ihm verteilte geringe Albumosenmengen voraussichtlich aufserordentlich fest zurück, und es dürfte ebensowenig gelingen, letztere durch einfache Extraktion mit erwärmtem Wasser genügend in Lösung zu bringen, als es glückt, aus dem beim Kochen eines Hühnereies zur Gerinnung gebrachten Eierklar durch einfache Extraktion mit Wasser irgend erhebliche Mengen des darin reichlich vorhandenen Ovomucoids zu gewinnen. Abgesehen davon ist übrigens bei der vorerwähnten Behandlung der oft beobachtete Übergang von primären Albumosen in für neutrale Flüssigkeiten unlösliche Modifikationen*) nicht ausgeschlossen.

Die Ansicht Neumeisters, dafs Albumosen und Peptone im Blute völlig fehlen, hat wohl auch deswegen so allgemeine Verbreitung gefunden, weil Neumeister zeigen konnte, dafs beim Kochen genuiner Eiweifskörper mit Wasser (namentlich angesäuertem Wasser) unter Umständen Albumosen entstehen können.

Dieser Befund mahnt gewifs zur äufsersten Vorsicht in der Beurteilung schwacher Biuretreaktionen im Filtrate von durch Erhitzen koagulierten Eiweifskörpern.

Dennoch glauben wir, dafs unsere eigenen, nunmehr zu schildernden Versuche mit gröfster Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein von Albumosen im Blute hinweisen.

Zur Koagulation des Blutes bedienten wir uns, ebenso wie früher zu der des Darms, einer einprozentigen, siedenden Lösung von primärem Kaliumphosphat. In diese flofs das Blut in dünnem Strahle hinein; das Kochen des Blutes mit der Phosphatlösung dauerte 5 bis 40 Minuten.

Danach wurde die Flüssigkeit mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und blieb 24 Stunden stehen. Ein gemessener aliquoter Teil des alsdann gewonnenen klaren Filtrates wurde auf dem Wasserbade auf ein bestimmtes Volumen eingeengt, und mit dem halben Volumen konzentrierter Zinksulfatlösung, die 0,4 proz. konzentrierte Schwefelsäure enthielt, versetzt.

Mit dem nun gewonnenen klaren Filtrat wurde die Biuretreaktion angestellt. Diese fiel in der Mehrzahl der Fälle positiv, in einigen negativ aus; wo sie positiv war, trat bei Sättigung mit Zinksulfat eine Trübung ein, die sich bald in einen an der Oberfläche schwimmenden Niederschlag verwandelte.

Dafs es sich bei den die Biuretreaktion verursachenden Körpern

*) Vergl. E. P. Pick, diese Beiträge 2, 486.

um präformierte Albumosen und nicht um die Kunstprodukte einer unzureichenden Methode handelte, glauben wir aus folgendem mit grofser Wahrscheinlichkeit schliefsen zu dürfen:

1. Wir haben mehrfach dieselbe Menge des gleichen Blutes*) verschieden lange mit siedender Phosphatlösung behandelt, z. B. eine bestimmte Blutmenge 10 Minuten lang, eine gleiche Menge desselben Blutes 40 Minuten lang mit der Phosphatlösung im Sieden erhalten; die Biuretreaktionen der nach $^1/_3$-Zinksulfatsättigung erhaltenen Filtrate, die gleichen Blutmengen entsprachen, waren gleich stark.

2. Blut von verschiedenen Tieren, in möglichst gleichartiger Weise behandelt, wies häufig sehr verschieden starke Biuretreaktionen auf.

3. Es kam vor, dafs die Biuretreaktion in einem Blute, von dem gleiche Teile verschieden lange mit Phosphatlösung erhitzt waren, völlig fehlte. Dieses Verhalten ist geradezu unerklärlich, falls man annimmt, dafs erst durch die Koagulation aus den normal vorhandenen Eiweifskörpern Albumosen entstehen, oder dafs die Biuretreaktion auf Resten von nicht koagulierten Eiweifskörpern beruht.

Wären die Biuretreaktion gebenden Filtratkörper ausschliefslich ein Produkt der Hitzekoagulation des Blutes und der sich daran anschliefsenden weiteren Behandlung, so müfste ihre Menge im wesentlichen mit der Dauer der Hitzekoagulation u. s. w. variieren, nicht aber, wie es thatsächlich der Fall ist, ausschliefslich mit der untersuchten Blutart.

Auf Grund unserer Untersuchungen müssen wir also annehmen, dafs im normalen Blut Albumosen vorkommen können. Zu dem gleichen Ergebnisse gelangten verschiedene ältere Autoren, deren Versuche neuerdings aber nicht als beweiskräftig angesehen wurden. Namentlich hat bereits Hofmeister, der sich ausführlich mit den „Peptonen“ im Blute beschäftigte, unter Benutzung der Eisenmethode ähnliche Doppelversuche wie wir und zwar mit ähnlichem Erfolge angestellt.

Auch der Frage, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Albumosenresorption vom Darme aus und dem Auftreten von Albumosen im Blute besteht, suchten wir näher zu treten, ohne jedoch über einige Anfangsversuche hinauszukommen. Wir wollen

*) Das Blut wurde stets aus der Carotis von Hunden entnommen und sofort verarbeitet.

hier nur hervorheben, dafs wir mehrfach auch im Blute verdauender Hunde keine Albumosen nachweisen konnten; andererseits gelang uns dieser Nachweis zu verschiedenen Malen bei Hungertieren. Doch mufs die Entscheidung der eben erwähnten Frage späteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

1. Beim Liegen der trypsinfreien, überlebenden Darmwand zur Zeit der Eiweifsresorption ist eine Änderung in der Menge der koagulablen Eiweifssubstanzen ebensowenig wie ein Verschwinden der Biuretreaktion gebenden Filtratkörper zu beobachten.

Es findet also augenscheinlich in der überlebenden Darmwand weder eine Rückbildung von koagulablem Eiweifs aus Albumosen und Peptonen noch eine Spaltung von Albumosen und Peptonen in nicht mehr die Biuretreaktion gebende Produkte statt.

2. Im Blute finden sich allem Anschein nach häufig Albumosen vor. Obgleich vorderhand Anhaltspunkte für einen direkten Zusammenhang des Auftretens von Albumosen im Blute mit der Eiweifsresorption vom Darme aus nicht gewonnen wurden, mufs dennoch an der Möglichkeit festgehalten werden, dafs von der Darmwand aufgenommene Albumosen als solche ins Blut übertreten.

Anmerkung bei der Korrektur. Während Cohnheim in seinen ersten Untersuchungen über das Erepsin, wie bereits oben hervorgehoben, es unentschieden läfst, ob das Erepsin ins Darmlumen secerniert wird, oder innerhalb der Darmwand zur Wirkung gelangt, spricht er sich in einer erst nach Abschlufs vorliegender Arbeit erschienenen Mitteilung [Zeitschr. f. physiol. Chem. 36, 13 (1902)] dahin aus, dafs „das Erepsin neben seinem jetzt nachgewiesenen Vorkommen im Darmlumen auch intracellulär wirken kann und, wie bestimmt anzunehmen ist, auch wirklich wirkt".

Innerhalb der überlebenden Darmwand findet nach unseren Untersuchungen eine derartige Spaltung von Pepton durch Erepsin jedenfalls nicht statt.

VI.

Die Goldzahl und ihre Verwertbarkeit zur Charakterisierung von Eiweifsstoffen.

Von **Fr. N. Schulz** und **R. Zsigmondy.**

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Jena.)

Einleitung.

Eine kolloidale Lösung von Gold, nach den Vorschriften, die Zsigmondy gegeben hat*), dargestellt, wird durch Zusatz eines Elektrolyten, z. B. Kochsalz, gefällt. Diese Fällung äufsert sich darin, dafs die vorher schön rote Farbe der Lösung in Blau umschlägt, ähnlich wie eine rote Lackmustinktur beim Alkalisieren. Dieser Farbenumschlag entspricht einer nicht umkehrbaren Zustandsänderung des kolloidalen Goldes, welche mit dem Koagulieren mancher anorganischer Kolloide verglichen werden kann. Nach einigem Stehen setzt sich das veränderte Gold als blauschwarzer Niederschlag zu Boden; die überstehende Flüssigkeit ist farblos geworden. Dieses Verhalten der Goldlösung wird wesentlich modifiziert durch die Anwesenheit anderer Kolloide, z. B. durch geringe Mengen von Leim. Die Gegenwart von Leim vermag das kolloidale Gold gegen die fällende Wirkung eines Elektrolyten, z. B. Kochsalz, zu schützen, so dafs die Goldlösung trotz Zusatz eines solchen ihre ursprüngliche schön rote Farbe behält und auch beim Stehen kein Gold absetzt. Der Schutz, den der Leim in diesem Falle ausübt, ist kein absoluter, sondern ein relativer; er hängt ab von dem gegenseitigen Mengenverhältnis von kolloidal gelöstem Gold, Leim, zugesetztem Elektrolyten, sowie auch von der Konzentration. Nimmt man die Menge des kolloidalen Goldes und des zugesetzten Chlornatriums sowie deren Konzentration konstant, und variiert die Leimmenge, so findet man eine untere Grenze, bei der die Menge

*) Zeitschr. f. analyt. Chemie 40, 697 (1901).

des zugesetzten Leims nicht mehr ausreicht, um das kolloidale Gold gegen die fällende Wirkung des Kochsalzes zu schützen. Diese untere Grenze ist hinreichend scharf, um sich zahlenmäfsig ausdrücken zu lassen. Hierauf gründet sich der von Zsigmondy aufgestellte Begriff der Goldzahl, die sich demnach folgendermafsen definieren läfst: Diejenige Anzahl von Milligrammen Kolloid, welche eben nicht mehr ausreicht, um 10 ccm einer gut bereiteten hochroten Goldlösung vor dem nach Zusatz von 1 ccm 10 proz. Chlornatriumlösung (sofort oder nach kurzer Zeit) eintretenden Farbenumschlag nach Violett oder dessen Nuancen zu bewahren, wird als Goldzahl bezeichnet.

Eine derartige Goldzahl läfst sich nicht nur für den Leim, sondern auch für viele andere Kolloide bestimmen, z. B. Eiweifs, Kasein, Gummi, Stärke.

Zsigmondy hat in einer ausführlichen Publikation für eine grofse Reihe von Handelskolloiden die Goldzahl bestimmt und genaue Vorschriften über die Art und Weise der Bestimmung gegeben. Die überraschend grofsen Unterschiede in dem Werte der Goldzahl (Leim 0,005 bis 0,01; Albumin aus Eiern 0,1 bis 0,2; Dextrin 10 bis 20, bezw. 40 bis 80) liefsen erwarten, dafs auch die Goldzahlen besser definierter Kolloide grofse und für deren nähere Charakterisierung wertvolle Unterschiede aufweisen würden.

Die vorliegende Untersuchung hatte zunächst zur Aufgabe, das Eierklar nach den Regeln des physiologischen Chemikers zu fraktionieren und die einzelnen Fraktionen, für sich getrennt, auf ihr Verhalten gegenüber der kolloidalen Lösung von Gold zu untersuchen.

1. Methodisches über die Bestimmung der Goldzahl.

Zur Erleichterung des Verständnisses seien hier die wichtigsten Vorschriften aus den früheren Publikationen von Zsigmondy kurz wiedergegeben und mit einigen Ergänzungen versehen.

Zur Bestimmung der Goldzahl verfährt man am besten in folgender Weise: In kleinen Bechergläsern (etwa 50 ccm) werden der Reihe nach steigende Mengen der zu untersuchenden Kolloidlösung (von bekannter Konzentration) gebracht*) und zwar gewöhnlich 0,005; 0,01; 0,02; 0,05 u. s. w. bis 0,5 ccm; grössere Mengen sind zu vermeiden, da hierdurch die Konzentration wesentlich beeinflufst wird. Das Abmessen geschah mit einer in $^1/_{1000}$ ccm geteilten 0,2 ccm-Pipette.

*) Der Eiweifsgehalt wurde zur Orientierung bei Vorversuchen nach Esbach bestimmt. Bei allen wichtigen Hauptversuchen wurde aufserdem

Hierauf wurde aus der von Schulz für diesen Zweck konstruierten Pipette *), welche ein sehr schnelles Abmessen und Einfüllen gestattet, je 5 ccm der Goldlösung unter raschem Umschütteln eingeblasen. Schliefslich wurde nach Verlauf von 3 bis 5 Minuten je $^1/_2$ ccm einer 10 proz. Kochsalzlösung (100 g NaCl in 900 g Wasser gelöst), gleichfalls unter Bewegung der Flüssigkeit, zugemischt.

Man findet auf diese Weise leicht die obere Grenze, bei welcher kein Farbenumschlag in Violett, und eine untere Grenze, bei welcher ein Farbenumschlag in Violett oder Blau eintritt. Für beide Grenzen ergeben sich aus der bekannten Konzentration und dem Volum der Kolloidlösungen die Mengen des hinzugesetzten Kolloids, die, in Milligramm ausgedrückt und mit 2 multipliziert, das Zahlenintervall ergeben, welches die Goldzahl einschliefst.

Wegen der in der Nähe des Umschlagpunktes stets auftretenden allmählichen Farbenübergänge läfst sich die Goldzahl nicht vollkommen genau bestimmen. Wir haben es daher vorgezogen, statt der Goldzahl das erwähnte Zahlenintervall anzugeben. Mit Absicht wurde dieses Intervall meist weiter genommen, als der erreichbaren Genauigkeit entspricht, einesteils um bei der Arbeit rascher vorwärts zu kommen, anderenteils aber mit Rücksicht auf kleine Verschiedenheiten der zu verschiedenen Zeiten hergestellten Goldlösungen, sowie um uns vor vorzeitigen Schlüssen auf grund geringer Differenzen zu bewahren.

Bei den von einem von uns (Zsigmondy) früher (l. c.) gegebenen Goldzahlen wurde etwas abweichend verfahren, indem die Grenzen daselbst enger gezogen und als obere Grenze gewöhnlich eine beträchtliche Verfärbung gegen Purpur oder Violettrot angesehen wurde. Dadurch erscheinen jene Goldzahlen gegen die in dieser Arbeit von uns mitgeteilten etwas nach abwärts verschoben.

Eine genauere Bestimmung der Goldzahl wird unseres Erachtens erst später am Platze sein, wenn eine Gewähr dafür gegeben ist, dafs nur Goldlösungen von stets genau gleichbleibender Qualität zur Verwendung gelangen **).

Um vergleichbare Zahlen zu erhalten, wird man sich möglichst genau an das hier angegebene Verfahren halten müssen, dessen Durchführung übrigens, wenn man einmal die erforderlichen Reagentien u. s. w. zur Verfügung hat, sehr leicht und bequem ist,

---

das Eiweifs durch Wägung direkt bestimmt, und zwar entweder durch Wägung des getrockneten Koagulums, oder wo dieses nicht angängig (ovomukoidhaltige Lösungen) durch Wägung des Gesamttrockenrückstandes, von dem die unverbrennbaren Aschenbestandteile, sowie eventuell das durch eine Schwefelsäurebestimmung ermittelte Ammonsulfat abgezogen wurde.

*) Vgl. unter „Kürzere Mitteilungen“ dieses Heft.

**) Etwa dadurch, dafs eine Fabrik die Erzeugung und Garantie dafür übernimmt.

umsomehr als das Abmessen der Flüssigkeiten (abgesehen von der zu prüfenden Kolloidlösung) keine so grofse Sorgfalt erfordert, wie sie bei analytischen Verfahren nötig ist. Näheres in bezug auf die Begründung dieser und der folgenden hier gegebenen Vorschriften findet sich in der citierten Abhandlung des einen von uns. (Zs.)

Mit Rücksicht auf den dort schon ausgesprochenen Satz, dafs alle Lösungen wirksamer Kolloide sich mit der Zeit so verändern, dafs ihre Wirksamkeit gegen kolloidales Gold sich vermindert, wird man darauf zu achten haben, dafs die Goldzahlen womöglich an frisch bereiteten Kolloidlösungen bestimmt werden.

Schon mehrtägiges Stehen während der Dialyse kann die Goldzahlen mancher Kolloide wesentlich beeinflussen; eine unserer ersten Aufgaben war es daher, uns zu überzeugen, ob die frisch gefälltem Albumin, Globulin u. s. w. anhaftenden Mengen von Ammonsulfat die Bestimmung der Goldzahl so weit beeinflussen, dafs die Entfernung derselben durch Dialyse erforderlich erscheint oder nicht. Dahin abzielende Versuche haben nun ergeben, dafs man eine ungünstige Beeinflussung nicht zu befürchten hat, wenn man die abfiltrierten, ammonsulfathaltigen Niederschläge vor ihrer Wiederauflösung auf einen Thonteller bringt und so lange darauf beläfst, bis sie wachsartige Konsistenz angenommen haben. Wir haben weiterhin stets so verfahren: Die bis zur Wachskonsistenz auf Thontellern getrockneten Niederschläge wurden in Wasser gelöst (meist 5 g auf 100 ccm), hierauf wurde in einem Teile der Lösung, eventuell nach weiterem Verdünnen, die Goldzahl, in einem anderen Teile der Kolloidgehalt, wie oben (S. 138) angegeben, bestimmt.

Auch der bei der Krystallisation des Eieralbumins übliche Zusatz von Schwefelsäure dürfte keinen wesentlichen Einflufs auf den Wert der Goldzahl dieser Körper haben, wie aus späteren Versuchen zu ersehen ist.

Einen grofsen Einflufs auf die Höhe der Goldzahl hat erfahrungsgemäfs die Qualität der Goldlösung. Das Verfahren ihrer Herstellung ist aber so weit ausgearbeitet, dafs zu erwarten ist, dafs andere Forscher ohne Schwierigkeit zu Flüssigkeiten von gleich erBeschaffenheit gelangen werden*). Zur Sicherheit wurde

*) Es ist mir gleich bei der ersten Versuchsreihe gelungen, schön rote und als Reagens verwendbare Goldlösungen zu erzielen. Durch einen erstmaligen Mifserfolg lasse man sich nicht abschrecken, sondern wiederhole den Versuch mit denselben Reagentien. Schulz.



jede neue zur Verwendung kommende Goldlösung bei Beginn und zum Schlufs der Benutzung in bezug auf ihren Wirkungswert mit einer 0,5 proz. Lösung von Merckschem Albumin geprüft. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Goldlösungen waren so gering, dafs die mit denselben gewonnenen Goldzahlen in dasselbe Zahlenintervall fielen (s. später).

Zur Erleichterung der Nachprüfung mag hier die schon früher von dem einen von uns publizierte Vorschrift nochmals wiedergegeben werden.

Herstellung der Goldlösung.

120 ccm Wasser, welches durch Destillation von gewöhnlichem destilliertem Wasser unter Anwendung eines Silberkühlers *) hergestellt und in einem Kolben aus Jenaer Geräteglas aufgefangen wurde, werden in ein Jenaer Becherglas von 300 bis 500 ccm Inhalt gebracht und zum Kochen erhitzt. Während des Erwärmens fügt man 2,5 ccm einer Lösung von Goldchlorid-Chlorwasserstoff **) (6 g der Krystalle von $AuCl_4H, 3H_2O$ auf 1 Liter mit destilliertem Wasser verdünnt) und 3 bis 3,5 ccm einer Lösung von reinstem Kaliumkarbonat (0,18-normal) hinzu.

Gleich nach dem Aufkochen fügt man unter lebhaftem Umschwenken der Flüssigkeit (Glasstäbe aus weichem Glase sind zu vermeiden, solche aus Geräteglas dagegen anwendbar) ziemlich schnell, aber partieenweise 3 bis 5 ccm einer verdünnten Lösung von Formaldehyd (0,3 ccm käuflichen Formols in 100 ccm H_2O), am besten nach Entfernung der Flamme, hinzu und erwartet unter Umrühren den meist nach einigen Sekunden, längstens einer Minute, erfolgenden Eintritt der Reaktion. Man beobachtet dabei das Auftreten einer hellen, in wenigen Sekunden intensiv hochrot werdenden Farbe, die sich nicht weiter verändert.

Alle Flüssigkeiten, die zur Herstellung der Goldlösungen dienen, lassen sich längere Zeit ***) unverändert aufbewahren. Hat man sie einmal vorrätig, so wird man bei einiger Übung in einer Stunde leicht 1 bis 2 Liter Goldlösung und mehr herstellen können.

Die Kosten der Herstellung sind sehr geringe. 1 Liter Goldlösung enthält 0,005 bis 0,006 Proz. Au im Werte von 15 bis 18 Pfennigen.

---

*) Für die Herstellung eines solchen Kühlers kann man geeignete Silberröhren von der Firma W. C. Heraeus in Hanau beziehen; sie sind nicht sehr kostspielig. Auch werden chemische Fabriken sich gewifs bereit finden, nach Vorschrift bereitetes Wasser in den Handel zu bringen.

**) Krystalle, welche sich nach genügendem Eindampfen einer Lösung von reinem Gold in Königwasser beim Erkalten ausscheiden. Von Merck bezogenes Aurum krystall. flavum wurde mit demselben Erfolge verwandt.

***) Bei sehr langem Stehen wird allerdings die Pottasche- und die Formaldehydlösung unbrauchbar.

Eine gut bereitete Goldlösung soll folgende Eigenschaften haben: Sie soll, bei gewöhnlichem Tageslicht betrachtet, im auffallenden wie im durchfallenden Lichte ungetrübt erscheinen und hochrot gefärbt sein (in 6 bis 7 cm dicker Schicht nur das spektrale Rot und dieses nicht sehr geschwächt hindurchlassen, alle anderen Farben absorbieren). Sie soll sich zum Kochen erhitzen lassen, ohne Gold abzuscheiden. Das Auftreten von schwach bräunlichem diffusem Licht (einer geringen braunen Fluorescenz vergleichbar), in auffallendem Licht erkennbar, rührt von der Anwesenheit einer geringen Menge gröfserer Goldteilchen her und schadet meistens nichts. Es darf diese (falsche) Fuorescenz jedoch nicht so intensiv werden, dafs die Lösung im auffallenden Lichte beträchtlich getrübt erscheint.

Es ist zu beachten, dafs gute Goldlösungen, wie auch alle anderen kolloidalen Lösungen, sich durch längeres Stehen verändern und dann ohne vorherige Prüfung nicht mehr zu gebrauchen sind.

Die Prüfung wird am besten mit Gummi arabicum oder käuflichem Albumin von bekanntem Wirkungswert durch Bestimmung der Goldzahl geschehen.

Sollte es trotz wiederholter Versuche nicht gelingen, eine Goldlösung von den geforderten Eigenschaften zu erhalten, dann versucht man andere Reagentien oder man verlegt die Herstellung des destillierten Wassers oder auch der Goldlösung an einen anderen Ort*).

Im allgemeinen werden solche Fälle, wenn man nur genügend reines Wasser zur Verfügung hat, selten eintreten.

2. Fraktionierung des Eierklars und Bestimmung der Goldzahl der einzelnen Fraktionen.

Die Versuche wurden zum Teil mit einer Lösung von käuflichem, getrocknetem Eierklar (Mercks Albumin aus Eiern I, pulvis subtilis, Ph. G. III), zum Teil mit frischem Eierklar ausgeführt. Beide sind Gemenge einer gröfseren Anzahl verschiedener Eiweifsstoffe, die als Globulin, Albumin, Ovomucin, Ovomukoid unterschieden werden, ohne dafs damit ausgedrückt werden soll, dafs diesen Bezeichnungen chemische Individuen entsprechen. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dafs es sich auch hier noch um Sammelbegriffe für Klassen einander ähnlicher Eiweifsstoffe handelt.

Da es uns zunächst darauf ankam, zu prüfen, ob die Goldlösung als Reagens für Zwecke der physiologischen Forschung im allgemeinen mit Vorteil zu verwerten sei oder nicht, so haben wir uns darauf beschränkt, das Eierklar nach bekannten Methoden in die Hauptgruppen Globulin, Albumin, Ovomukoid zu zerlegen und deren Goldzahlen zu bestimmen, ohne Rücksicht darauf, dafs das Globulin sich nach neueren Untersuchungen von Langstein, Fuld und Spiro,

*) Es können Laboratoriumsdünste und dergleichen zuweilen die Herstellung in ungünstigem Sinne beeinflussen.

Eichholz, Obermeyer und Pick u. a. in mehrere Bestandteile zerlegen läſst. Wir überlassen es denjenigen Forschern, welche sich mit weitergehender Zerlegung dieser Eiweiſsgruppe befassen, etwa (sogar wahrscheinlich) vorhandene Unterschiede im Werte der Goldzahlen der aus einer Gruppe erhältlichen verschiedenen Eiweiſskörper festzustellen.

Aus dem gleichen Grunde wurde auch von eingehenden Elementaranalysen der von uns erhaltenen Produkte abgesehen, es wurde dagegen Gewicht darauf gelegt, den wichtigsten und am genauesten untersuchten Körper des Eierklars, das krystallisierte Albumin, durch fortgesetzte fraktionierte Fällung (in mehreren Versuchsreihen) so weit von Verunreinigungen zu befreien, daſs die Bestimmung der Goldzahl zu übereinstimmenden Werten führte.

Naturgemäſs erwuchs uns daraus noch die Aufgabe, das Verhalten der das krystallisierte Albumin begleitenden und diesem zunächst teilweise beigemengten Körper gegen die Goldlösung einer Prüfung zu unterziehen.

Es sei gleich hier vorweg bemerkt, daſs wir überraschend groſse Unterschiede im Verhalten des krystallisierten Albumins gegenüber dem der übrigen Eiweiſsstoffe feststellen konnten.

Am günstigsten liegen die Verhältnisse beim Globulin und Ovomukoid, da Lösungen dieser Körper sich verhältnismäſsig leicht von Beimengungen anderer Stoffe befreien lassen. Sie sollen daher zunächst besprochen werden.

A. Darstellung des Globulins und Bestimmung der Goldzahl desselben.

Zur Darstellung des Globulins wurde die zu untersuchende Lösung in der bekannten Weise durch Zusatz des gleichen Volums einer neutralen, wässerigen, konzentrierten Lösung von Ammonsulfat gefällt. Der entstehende Niederschlag wurde abfiltriert, von neuem in Wasser gelöst und durch nochmalige Filtration von ungelösten Teilen befreit.

Man stöſst hierbei bekanntlich auf Schwierigkeiten, da der unlösliche Anteil gelatinös aufquillt und dadurch die Filtration sehr verlangsamt*). Bei der Wiederholung der Fällung ist diese Schwierigkeit wesentlich geringer.

Die Ausfällung des Globulins wurde zweimal wiederholt. Das Filtrat von der dritten Fällung war frei von Eiweiſs (Albumin). Das so erhaltene Globulinpräparat entspricht der von Langstein als „löslichen Anteil des Gesamtglobulins“ untersuchten Substanz.

*) s. Leo Langstein, Über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol., 1, 83 bis 104 (1901). Diese Arbeit enthält die Litteratur über Fraktionierung des Eierklars, soweit sie für uns in Betracht kommt.



Dieselbe läſst sich durch fraktionierte Fällung mit Kaliumacetat nach den Ausführungen von Langstein in ein „Euglobulin", welches zwei Drittel des mit Ammonsulfat fällbaren Globulins beträgt, und einen bisher nicht faſsbaren anderen Körper, der bei halber Sättigung mit Kaliumacetat nicht gefällt wird, zerlegen. Die Verhältnisse scheinen hier also ähnlich zu liegen wie beim Blutserum, dessen Globulin nach Fuld und Spiro in einen durch Halbsättigung mit Kaliumacetat fällbaren Bestandteil (Euglobulin) und einen nicht fällbaren (Pseudoglobulin) getrennt werden kann. Das Euglobulin ist durch Dialyse leicht, das Pseudoglobulin nicht fällbar.

Wir haben uns darauf beschränkt, unser Globulin zunächst direkt zu untersuchen, ohne das die Lösung vermittelnde Ammonsulfat sowie einen Überschuſs daran durch Dialyse zu entfernen. Sodann wurde diese Lösung durch Dialyse so weit von Ammonsulfat befreit, daſs ein beträchtlicher Teil des Globulins gefällt wurde. Da der in Lösung bleibende Teil (hypothetisches Pseudoglobulin + Rest von Euglobulin) sich gegenüber der Goldlösung, innerhalb der Fehlergrenzen, ebenso wie die nicht dialysierte Lösung verhielt, so können wir vorläufig sagen, daſs unser Globulin sich gegen Goldlösung einheitlich verhält.

Das von Eichholz als neuer Bestandteil des Eierklars beschriebene Ovomucin wurde von uns nicht berücksichtigt, da eine Lösung des Ovomucins nur durch eingreifende Mittel zu erzielen gewesen wäre; es lag aber in unserer Absicht, die Versuchsbedingungen möglichst zu vereinfachen, um die bei der Eigentümlichkeit der Goldzahl zu erwartenden Störungen durch Nebenreaktionen u. s. w. möglichst auszuschalten. Bei der von uns gewählten Darstellung des Globulins wird dasselbe vom Ovomucin abgetrennt, so daſs eine Beimengung von Ovomucin bei dem untersuchten Globulin auszuschlieſsen ist.

Aus der nachstehenden Tabelle I ist ersichtlich, daſs die Goldzahl des Gesamtglobulins aus Hühnerei zwischen 0,02 und 0,05 liegt.

Die verschiedenen Präparate zeigen untereinander eine sehr gute Übereinstimmung, so daſs die Gröſsenordnung hinreichend scharf festgelegt ist. Auf eine noch genauere Bestimmung der Goldzahl, die vielleicht möglich ist, wurde aus schon anderweitig erörterten Gründen verzichtet. Nur nebenbei sei erwähnt, daſs die Goldzahl des Globulins aus Schweineserum in derselben Gröſsenordnung sich bewegt.

B. Darstellung des Ovomukoids und Bestimmung der Goldzahl desselben.

Das Ovomukoid ist, soweit unsere bisherigen Kenntnisse reichen, der einzige beim Erhitzen nicht koagulierbare Eiweiſsbestandteil des

Eierklars. Die Herstellung geschieht demnach am einfachsten, indem man durch Kochen, nach Zusatz von etwas Essigsäure, die koagulierbaren Stoffe ausfällt. Das Filtrat enthält dann das Ovomukoid, welches nunmehr durch Fällen mit Alkohol (oder auch Ammonsulfat) isoliert werden kann. In unseren Versuchen wurde das durch Kochen enteiweifste Filtrat von Merckscher Eiweifs-

Tabelle I *).

Kolloid	Nr.	Au Nr.	Datum	Milligramme Kolloid auf 10 ccm Goldlösung								
				0,005	0,01	0,015	0,02	0,025	0,03	0,04	0,05	0,06
Globulin aus Mercks Albumin **)	1	81	21. Dez. 01	Bl	Bl	—	V	0	0	—	0	—
	2	„	23. „ „	Bl	Bl	—	—	V	—	—	—	—
	3	82	5 Feb. 02	—	Bl	V	—	—	—	0	—	—
	4	„	11. „ „	Bl	—	Bl	—	—	0	—	—	0
Globulin aus Mercks Albumin***)	5	82	11. „ „	—	—	—	—	—	—	—	0	—
	6	„	12. „ „	—	V Bl	—	—	0	—	—	—	—
	7	„	12. „ „	—	—	—	1 V	0	—	—	0	—
Globulin aus frischen Eiern †)	8	89	11. Mrz. 02	Bl	—	—	—	V	—	—	0	—
Globulin aus Schweineserum ††)	9	82	14. Feb. „	—	V	—	—	Vr	—	—	0	—

*) In dieser und den nachfolgenden Tabellen bedeuten:
0 = keine Farbenänderung; 0-P geringe Änderung gegen Purpur,
P = Purpur; V = Violett; Vr = Violettrot; RV = Rotviolett; Bl = Blau, lP, lV, lBl = langsam P, V, Bl.

**) Dreimal mit Ammonsulfat gefällt; dialysiert vom 14. bis 23. Dezember, am 23. Dezember war ein unerheblicher Niederschlag vorhanden, derselbe nahm beim Aufbewahren noch zu. Zur Bestimmung der Goldzahl wurde die vom Niederschlag abgetrennte Lösung benutzt. Lösung: am 23. Dezember 0.20 Proz. Eiweifs, am 5. Februar 0,14 Proz. Eiweifs, Ammonsulfatgehalt 0,03 Proz.

***) Dreimal gefällt; vom 11. bis 12. Februar dialysiert; am 12. Februar von geringem Niederschlag abfiltriert. Filtrat enthielt 0,046 Proz. Eiweifs, 0,048 Proz. Ammonsulfat.

†) 20 Eier verarbeitet; dreimal gefällt. Lösung enthielt 0,24 Proz. Eiweifs, 0,04 Proz. Ammonsulfat.

††) Einmal gefällt, mit 1/2 konz. Ammonsulfatlösung gewaschen. Lösung enthielt 0,058 Proz. Eiweifs, reichlich Ammonsulfat.

lösung, sowie von verdünntem Eierklar benutzt (Näheres s. Tabelle II). Bei Besprechung des Albumins müssen wir auf das Ovomukoid noch ausführlicher zurückkommen.

Tabelle II.

Kolloid	Nr.	Au Nr.	Datum	Milligramme Kolloid auf 10 ccm Goldlösung									
				0,02	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1	0,12	0,16	0,18	0,2
Ovomukoid*)	9	81	10. Dez. 01	—	BlV	—	BlV	0	0	0	—	0	0
„ **)	10	82	18. Feb. 02	Bl	1 V	—	—	0	—	0	—	—	0
„ ***)	11	90	18. März „	Bl	—	1 V	—	—	1 P	—	0 P	—	—

Nach der vorstehenden Tabelle II liegt die Goldzahl des Ovomukoids zwischen 0,04 bis 0,08. Diese Goldzahl ist zwar verschieden von der des Globulins, jedoch genügen unsere bisherigen Erfahrungen nicht, um mit Sicherheit zu entscheiden, ob diese geringen Verschiedenheiten, die sich in derselben Gröfsenordnung bewegen, zu besonderen Schlüssen berechtigen. Das von den anderen etwas abweichende Ovomukoid ***) wird später noch besonders berücksichtigt.

C. Die Albumine des Eierklars und ihre Goldzahl.

Besondere Schwierigkeiten bietet die Untersuchung der als Albumin zusammengefafsten Eiweifsstoffe des Eierklars, hauptsächlich weil das Ovomukoid sich gegenüber dem Ammonsulfat ganz ähnlich wie das Albumin verhält, und weil eine Abtrennung des Albumins vom Ovomukoid ohne Denaturierung (Koagulation) des ersteren im günstigsten Falle sich nur für den krystallisierenden Albuminanteil bewerkstelligen läfst. Diesem Umstande ist es zuzuschreiben, dafs über das Albumin des Eierklars sich die verschiedenartigsten Angaben vorfinden. Selbst bei dem krystallisierten Albumin, das doch von vornherein am meisten Vertrauen verdient, widersprechen sich die Befunde der verschiedenen Autoren in wichtigen Punkten. Die gefundene Zusammensetzung schwankt

---

*) Lösung von 0,5 g Mercks Albumin, in 100 ccm Wasser + 1 Tropfen Essigsäure gekocht; Filtrat = 0,05 Proz. Ovomukoid.

**) Aus frischem Eierklar durch Kochen (nach vorsichtigem Ansäuern mit Essigsäure) 0,19 proz. Lösung.

***) Aus Fraktion III (s. später, S. 157) durch Kochen erhalten.

mehr, als durch erlaubte Analysenfehler erklärt werden kann. Während die einen das krystallisierende Albumin als etwas Einheitliches auffassen, glauben andere, dafs dasselbe ein Gemenge mehrerer Albumine von etwa derselben chemischen Zusammensetzung, aber von verschiedener Gerinnungstemperatur, Löslichkeit, spezifischer Drehung ist*).

Eine andere noch immer diskutierte Frage ist die, ob neben dem krystallisierten Ovalbumin noch ein oder mehrere andere, von diesem verschiedene Albumine im Eierklar präformiert sind. Osborne und Campbell, sowie Langstein haben diese Frage neuerdings zum Gegenstande von Untersuchungen gemacht, mit dem Ergebnis, dafs etwa die Hälfte des vorwiegend aus Albumin bestehenden Gesamteiweifs als krystallisierendes Albumin aus Eierklar gewonnen werden kann, ein anderer Teil des Albumins aber, von Osborne und Campbell als „Conalbumin" bezeichnet, von diesem höchst wahrscheinlich als verschieden anzusehen ist. Mit absoluter Sicherheit liefs sich eine derartige Verschiedenheit bisher nicht nachweisen, da die Unterscheidungsmerkmale, elementare Zusammensetzung, spezifische Drehung, Koagulationstemperatur, nur bedingten Wert besitzen. Um so gröfseres Interesse beansprucht daher die Bestimmung der Goldzahl.

C. I. Das krystallisierende Albumin und dessen Goldzahl.

Die Herstellung geschah in der üblichen, vielfach beschriebenen Weise**), indem das durch Halbsättigung mit Ammonsulfat von Globulin befreite Eierklar durch Zusatz einer $^1/_2$ proz. Schwefelsäure, die mit Ammonsulfat halb gesättigt war, bis zur deutlichen Trübung versetzt wurde. Beim Umkrystallisieren wurde keine Schwefelsäure mehr benutzt, sondern die Ausfällung nur durch Ammonsulfat bewirkt.

Das krystallisierte Albumin unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Eiweifskörpern (Globulin, Ovomukoid) durch eine sehr hohe Goldzahl, also geringen Wirkungswert. Zwei verschiedene Darstellungen lieferten uns Präparate mit einer Gold-

*) s. Langstein, l. c., S. 97 ff., auch bei Schulz, Die Krystallisation von Eiweifsstoffen und ihre Bedeutung für die Eiweifschemie. Jena, Verlag von Gustav Fischer, 1901.

**) Die Vorschriften der einzelnen Autoren weichen im kleinen voneinander ab; so verwendet Langstein zur Ausfällung $^1/_5$ N.-Schwefelsäure (etwa 1 Proz.); die Zusammensetzung der Krystallisationsflüssigkeit bleibt dabei fast die gleiche wie bei unserem Verfahren.

zahl, die zwischen 2 und 8 lag*), dieselbe ist so hoch, dafs man daran denken mufs, ob dem krystallisierten Albumin überhaupt eine Goldzahl zukommt, oder ob nicht etwa eine Verunreinigung für den geringen nachweisbaren Goldschutz verantwortlich zu machen ist.

Eine Verunreinigung mit 1 Proz. Ovomukoid würde genügen, um die Goldzahl zu erklären. Dagegen ist jedoch zu bemerken, dafs die Goldzahl, wenn das krystallisierende Albumin einmal die erforderliche Reinheit besitzt (s. später), durch weiteres Umkrystallisieren nicht an Wirkungswert verliert, also keine durch Umkrystallisieren entfernbare, durch Goldlösung erkennbare Verunreinigung mehr enthält.

Ausserordentlich lehrreich ist es, an der Hand der Goldzahl den durch Umkrystallisieren bewirkten fortschreitenden Reinigungsvorgang zu verfolgen.

Es ist von anderer Seite (Wichmann) darauf hingewiesen worden, eine wie grofse Neigung zu verunreinigenden Einschlüssen die Eiweifskrystalle haben. Es fehlen bisher zuverlässige Anhaltspunkte dafür, wann das Umkrystallisieren die erwünschte Reinigung bewirkt hat. Man ist gewohnt, ein zwei- bis dreimaliges Umkrystallisieren als genügend anzusehen, falls die Fällungen jedesmal rein krystallinisch ohne sichtbare amorphe Beimengungen sind. Die Bestimmung der Goldzahl hat uns gezeigt, dafs diese Annahme zu Täuschungen Anlafs geben kann.

Der einmal ausgefällte Krystallniederschlag ist stets noch recht unrein. Erst bei einer späteren (der dritten bis sechsten) Krystallisation ist die nunmehr konstant zwischen 2 und 8 liegende Goldzahl erreicht. Als weiteres Zeichen mangelhafter Reinigung haben die ersten (noch

---

*) Bei einer dritten Darstellung, bei welcher etwas mehr Säure verwandt wurde (die Krystallisation erfolgte daher nur mangelhaft), liefs sich durch Umkrystallisieren der „verunreinigende Körper“ (s. später, S. 152 dieser Abhandlung) überhaupt nicht entfernen und wir erhielten stets unvollständig krystallisierende Niederschläge, deren Lösung in der Goldlösung violettrote Trübung hervorrief. Die Lösungen dieser Krystalle liefsen beim Stehen für sich nach zwei bis drei Tagen einen weifsen Niederschlag fallen.

Es ist übrigens zu beachten, dafs bei den Lösungen von Körpern geringer Wirksamkeit (z. B. krystallisierendem Albumin) die Qualität der Goldlösung einen merklichen Einflufs auf die Goldzahl ausübt. Man vergleicht daher am besten Albumine verschiedener Darstellung mit ein und derselben Goldlösung, wenn man eventuelle Verschiedenheiten der ersteren feststellen will.

nicht genügend reinen) Krystallisationen die Eigentümlichkeit, dafs ihre Lösung auch ohne Zusatz von Kochsalz den roten Farbenton der Goldlösung in eine violette Trübung überführt. Diese violette Trübung kann sich eventuell durch Kochsalzzusatz sogar eher verringern, namentlich bei hoher Konzentration an Albumin erschwert sie aber die Bestimmung der Goldzahl so, dafs sich nur eine untere Grenze feststellen läfst, bei der die eintretende Blaufärbung *) anzeigt, dafs das Gold nicht mehr geschützt ist. Dies eigentümliche Verhalten ist, wie später gezeigt wird, auf die Anwesenheit einer Verunreinigung zurückzuführen, die erst bei häufigem Umkrystallisieren so vollständig entfernt wird, dafs die Goldlösung auch durch gröfsere Mengen der betreffenden Eiweifslösung nicht direkt (ohne Kochsalz) verändert und eine scharf bestimmbare Goldzahl erhalten wird.

In einem Versuche war ein dreimaliges Krystallisieren nötig, um die geforderten Eigenschaften zu erzielen (hohe Goldzahl, Fehlen des „verunreinigenden Körpers"). In einem zweiten und dritten Versuche hatte ein dreimaliges Umkrystallisieren jedoch nicht genügt. Bei einem anderen Versuche, bei welchem die Krystallisation besonders gut geglückt war, so dafs Krystalle erhalten wurden von so schöner Ausbildung, wie man sie selten beobachtet, erwies sich erst die fünfte und sechste Krystallisation als genügend rein.

Es gelingt also, mit Hülfe der Goldlösung Unterschiede in der Qualität von Eiweifslösungen festzustellen, die bisher höchstens durch die Elementaranalyse sich hätten aufdecken lassen. Vielleicht wird es möglich sein, an der Hand dieser Erfahrungen eine Einigung über die Zusammensetzung des reinen krystallinischen Albumins, besonders über den Schwefelgehalt desselben zu erzielen, jedenfalls kann schon jetzt als sicher bezeichnet werden, dafs die als rein analysierten Präparate von krystallisierendem Albumin zum Teil nicht völlig von Verunreinigungen befreit gewesen sein werden.

Auch der Ansicht, dafs es verschiedene krystallisierende Albumine giebt, dürfte dadurch, dafs eine wechselnde Verunreinigung der verschiedenen Krystallniederschläge durch die Goldzahl nachweisbar ist, eine weitere Stütze entzogen sein.

Die durch Umkrystallisieren in unserem Sinne gereinigten Eiweifslösungen lassen sich durch Fraktionierung nicht weiter in einer durch die Goldlösung erkennbaren Weise zerlegen.

Eine Lösung von Krystallen, in denen sich durch die Goldlösung keine Verunreinigungen nachweisen liefsen, wurde durch einen möglichst geringen Überschufs an Ammonsulfat zur Krystallisation gebracht.

*) Unter Fällung des Goldes, das nach 6- bis 24stündigem Stehen als blauschwarzer Niederschlag den Boden des Glases bedeckt.

Die von dieser ersten Fraktion abfiltrierte Mutterlauge, welche noch eiweifsreich war, wurde durch Mehrzusatz von Ammonsulfat nochmals gefällt. Zwar war nur die erste Abscheidung krystallinisch, während die zweite Fraktion, wahrscheinlich wegen zu rascher Ausfällung, amorph blieb, trotzdem war die Goldzahl der beiden Fraktionen genau die gleiche und auch übereinstimmend mit der nicht fraktionierten Lösung.

Es sei ausdrücklich erwähnt, dafs die Goldzahl des krystallisierten Eiweifs, sowie das ganze Verhalten sich nicht wesentlich änderte, wenn durch kurz dauernde Dialyse das anhaftende Ammonsulfat entfernt wurde.

Tabelle III.

Kolloid	Nr.	Datum	Au Nr.	Milligramme Kolloid auf 10 ccm Goldlösung				
				0,8	2	4	8	16
Krystall. Albumin, dreimal krystallisiert, nicht dialysiert	12	10. März 1902	89	Bl	l-Vr	0	0	—
dito: dialysiert	13	12. „ „	89	Bl	l-V	V-P	0	—
„ „	14	13. „ „	89	Bl	V	l-P	0	—
„ „	15	14. „ „	90	Bl	V	l-V	0	—
„ „	16	15. „ „	90	Bl	l-V	l-P	0	—
„ „	17	17. „ „	90	Bl	Bl	V	—	0

In dieser Zusammenstellung wurde nur das eine Präparat von krystallisiertem Albumin berücksichtigt. Die Einfügung der anderen Präparate in die Zusammenstellung würde nur eine Wiederholung bedeuten.

Im nachfolgenden wurde auf das Wiedergeben der Versuchsresultate in Form von Tabellen verzichtet, da einmal keine reinen Präparate zur Untersuchung gelangten, und da ferner diese Tabellen nur zur Veranschaulichung dienen sollen, in welcher Weise wir die Goldzahl festlegten.

Wenn unsere vorher dargelegte Vorstellung richtig ist, so mufsten wir die Verunreinigungen in den Krystallisationsmutterlaugen wiederfinden. In der That gelang uns durch Untersuchung der amorphen Bestandteile der Krystallisationsmutterlaugen eine völlig befriedigende Aufklärung.

C. II. Der nicht krystallisierende Albuminanteil.

Nach den bisherigen Erfahrungen war zu erwarten, dafs aus den Krystallisationsmutterlaugen durch fraktioniertes Aussalzen mit Ammonsulfat inkonstante Gemenge eines oder mehrerer Albumine (Conalbumin) mit Ovomukoid erhalten werden. Trotzdem also die

im nachfolgenden zu beschreibenden amorphen Albuminfraktionen sicherlich keine chemischen Individuen repräsentieren, hat uns die Bestimmung der Goldzahl derselben doch mit einigen interessanten Thatsachen bekannt gemacht. Es sei hier zunächst die Versuchsreihe, bei welcher die Verhältnisse am einfachsten liegen, etwas ausführlicher geschildert.

Die Mutterlauge der auf Säurezusatz ausgeschiedenen Krystalle wurde mit konzentrierter Ammonsulfatlösung versetzt, bis eine deutliche Fällung auftrat. Nach 24 Stunden hatte sich ein voluminöser Niederschlag abgesetzt, der im wesentlichen amorph war; ganz vereinzelte Sphärolithen zeigten an, dafs noch geringe Mengen krystallisierbaren Albumins der ersten Fällung entgangen waren. Es wurde abfiltriert und das Filtrat nochmals mit konzentrierter Ammonsulfatlösung gefällt. Das Filtrat von dieser dritten völlig amorphen Fällung koagulierte nicht mehr beim Kochen, gab keine Biuretreaktion und übte auch keinen nachweisbaren Goldschutz mehr aus. Es ist also die Mutterlauge von der ersten Krystallabscheidung in zwei amorphe Teile, die als Fraktion II und III bezeichnet werden sollen, zerlegt. Beide Fraktionen enthielten neben durch Kochen koagulierbarem Albumin beim Erhitzen in essigsaurer Lösung nicht koagulierendes Ovomukoid.

Bei Fraktion II fanden wir ein eigentümliches Verhalten, ganz ähnlich dem bei ungenügend gereinigtem krystallinischem Albumin beschriebenen. Dieses Verhalten machte es unmöglich, eine Goldzahl zu bestimmen.

Während Globulin, Ovomukoid u. s. w. die Farbe des kolloidalen Goldes nicht nur nicht verändern, sondern sogar den Farbenumschlag, den Kochsalzzusatz hervorruft, zu verhindern vermögen, hat diese Fraktion (auch nach Reinigung durch Dialyse) die Eigenschaft, ohne Elektrolytzusatz in Goldlösungen einen violetten Niederschlag zu erzeugen, der allerdings als violette Trübung lange suspendiert bleibt, aber nach genügendem Stehen der Mischung zuweilen zu Boden fällt. Ist ein genügender Überschufs von Fraktion II (etwa 5 mg auf 10 ccm Goldlösung) vorhanden, so bewirkt Kochsalzlösung ein Auflösen der violetten Trübung unter Wiederherstellung der roten Farbe *).

Das eigentümliche Verhalten dieser Fraktion ist darauf zurückzuführen, dafs sie aus zwei Körpern **) besteht, die sich durch Aufkochen voneinander trennen lassen. Der eine — durch Kochen koagulierbare Körper (ein Albumin) — löst sich nach dem Koa-

*) Ein ähnliches Verhalten hatten wir bei einer Lösung von Methämoglobin beobachtet.

**) Vielleicht auch mehreren.

gulieren in erwärmter Natronlauge und übt dann einen hohen Goldschutz aus. Der andere, nicht koagulable, bewirkt, in verschiedensten Mengenverhältnissen der Goldlösung zugesetzt, eine in Kochsalzlösung nicht auflösbare schmutzig violette Trübung.

Dieser, in seinen allgemeinen chemischen Eigenschaften nicht näher untersuchte „verunreinigende Körper“ hat die Eigenschaft, die Goldlösung violett zu färben, selbst wenn er anderen wirksamen Kolloiden beigemengt ist. Man erhält bei seiner Gegenwart in Albumin-, Ovomukoid- u. s. w. Lösungen jene unscharfen Übergänge, welche wir bei krystallisiertem Albumin beschrieben haben, und wir führen mit gutem Grunde auch dort jene unscharfen Übergänge auf die Gegenwart des „verunreinigenden Körpers“ zurück.

Wir vermuten, daſs der „verunreinigende Körper“ durch die bei der Krystallisation verwandte Schwefelsäure erzeugt wird. Es gelang uns zwar nicht, künstlich durch Säure aus Albuminlösungen den verunreinigenden Körper zu erzeugen, insbesondere sei hervorgehoben, daſs dem Acidalbumin die Eigenschaften des „verunreinigenden Körpers“ fehlen; wir haben aber einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Menge des „verunreinigenden Körpers“ und der Menge der bei der Krystallisation angewandten Schwefelsäure beobachtet, ohne damit sagen zu wollen, daſs der „verunreinigende Körper“ ausschlieſslich der Säurewirkung seine Entstehung verdankt.

F r a k t i o n III. Im Gegensatz zu Fraktion II lieferte Fraktion III wieder eine gut bestimmbare G o l d z a h l, und zwar 0,03 bis 0,06.

Die nicht dialysierte Lösung der Fraktion III (Gehalt an Eiweiſs und anhaftendem Ammonsulfat ungefähr zu gleichen Teilen) koagulierte beim Kochen fast vollständig, so daſs das Filtrat vom Koagulum nur geringe Mengen wirksamen Kolloids enthielt, übrigens auch nur schwache Biuretreaktion gab. Nachdem aber die Hauptmasse des Ammonsulfats durch Dialyse entfernt war, lieſs sich ein reichlicher Gehalt an Ovomukoid feststellen *). Diese Ovomukoidlösung hatte eine gewisse Ähnlichkeit mit jener aus

*) Bei einer anderen Versuchsreihe wurde gleichfalls die Beobachtung gemacht, daſs die Ausbeute an Ovomukoid erheblich gröſser wird, wenn das Ammonsulfat, beziehungsweise die anhaftende Schwefelsäure durch Dialyse entfernt wird. Reine Ovomukoidlösungen, mit Ammonsulfat, bezw. Ammonsulfat und Schwefelsäure versetzt (ohne daſs Fällung in der Kälte auftritt), koagulieren beim Kochen nicht. Es fehlt also vorläufig eine befriedigende Erklärung für diese Beobachtung.

Unsere Trennung des Ovomukoids von Albumin beruhte auf der Nichtkoagulierbarkeit desselben beim Kochen. Wir haben dabei die alt bekannte

Fraktion II, da auch hier die Übergänge unscharf waren, und auch bei gröfseren Mengen Kolloid eine leichte Verfärbung nach Purpur eintrat. Es ist also auch hier der „verunreinigende Körper", wenn auch in geringerer Menge, zugegen. Bei der Untersuchung der Gesamtfraktion trat die störende Wirkung zurück, nachdem aber die Hauptmasse des gut wirkenden Kolloids durch Koagulation entfernt war, machte sich dieselbe deutlich geltend.

Bei einer Wiederholung der Versuchsreihe wird es natürlich nicht stets gelingen, genau dieselben Fraktionen wieder zu erlangen, da die vorher beschriebene Fraktionierung bis zu einem gewissen Grade willkürlich war. In der That fanden wir denn auch bei der Wiederholung Abweichungen, die sich aber alle ungezwungen auf die Ergebnisse der Versuchsreihe I zurückführen lassen. Die Krystallisationsmutterlauge enthält stets neben Ovomukoid einen koagulablen Stoff mit hoher Goldzahl und wechselnde Mengen des „verunreinigenden Körpers". Der letztere steht in seinem Verhalten gegen Ammonsulfat dem krystallisierenden Eiweifs am nächsten, so dafs er gerade diesem am meisten und am hartnäckigsten anhaftet. Es ist sogar möglich, dafs die amorphen Fraktionen frei vom verunreinigenden Körper bleiben, der dann erst in den Mutterlaugen beim Umkrystallisieren von den Krystallen abgetrennt erscheint.

C. III. Einflufs der Versuchsbedingungen auf die Goldzahl.

Wir mufsten uns nunmehr die Frage vorlegen, ob die auffallenden Verschiedenheiten in der Gröfsenordnung der Goldzahl und dem allgemeinen Verhalten gegenüber der Goldlösung, die wir bei den verschiedenen Bestandteilen des Eierklars feststellen konnten, nicht ganz oder zum Teil eine Folge der wechselnden Versuchsbedingungen sei.

Dafs die Verschiedenheit im Salzgehalt, speziell im Gehalt an Ammonsulfat, keinen wesentlichen Einflufs ausübt, ist schon vorher erwähnt (S. 140 dieser Abhandlung) und geht aufserdem aus dem Vergleich der Goldzahlen hervor, die zum Teil an dialysierten, zum

Eigenschaft dialysierter Eiweifslösungen, beim Kochen gar nicht oder unvollkommen zu koagulieren, wohl berücksichtigt. Die Koagulation der dialysierten Lösung geschah nach schwachem aber deutlichem Ansäuern mit Essigsäure unter Zusatz geringer Mengen von Kochsalzlösung. Es wurde darauf geachtet, dafs sich ein richtiges, festes Koagulum bildete und das Filtrat völlig klar war, was bei unvollständig koagulierenden, dialysierten Eiweifslösungen nicht zu erreichen ist. Eine Bildung von Acidalbumin oder gar von Albumosen hatte während der Dialyse nicht stattgefunden.

Teil an nicht dialysierten Präparaten gewonnen wurden. Wenn innerhalb derselben Fraktion der verschiedene hier in Betracht kommende Salzgehalt keinen nennenswerten Einfluſs hat, so kann die Verschiedenheit der Fraktionen untereinander ebenfalls nicht in dieser Weise erklärt werden.

Auch eine wechselnde Acidität bezw. Alkalescenz kann nicht als Ursache der Verschiedenheiten in der Gröſsenordnung gelten. Die Ausfällung des Globulins geschieht bei schwach alkalischer Reaktion (wie sie dem Eierklar zukommt). Die übrigen Fraktionen werden bei schwach saurer Reaktion erzeugt. Nun ist zwar der Zusatz von verdünnter Säure oder verdünntem Alkali nicht ganz ohne Einfluſs auf das Verhalten gegenüber der Goldlösung*), wie im nachfolgenden gezeigt wird, aber der Einfluſs ist unbedeutend im Vergleich zu den sehr groſsen Unterschieden der Goldzahlen von krystallisiertem Albumin einerseits und den übrigen Eiweiſskörpern andererseits; auch liegt er zum Teil nach der entgegengesetzten Seite.

Die zur Krystallisation verwandte Schwefelsäuremenge ist gering. In einem Versuche wurden bei Verwendung von 560 ccm mit Ammonsulfat halbgesättigter Albuminlösung 55 ccm mit Ammonsulfat halbgesättigter $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure gebraucht, bis gegen Lackmus eben saure Reaktion eintrat; dann waren noch 25 ccm zur Ausfällung nötig. Es waren also im höchsten Falle 0,025 Proz. freie Schwefelsäure zugegen. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei allen Versuchen.

Es wurde zunächst der Einfluſs von verdünnter Schwefelsäure auf die Goldzahl untersucht. Globulinlösung behielt dieselbe Goldzahl, auch wenn dieselbe mit $^1/_5$ N-Schwefelsäure zu gleichen Teilen versetzt wurde. Bei krystallisiertem Albumin**) dagegen traten deutliche Veränderungen zu Tage. Sehr geringe Mengen Säure (etwa 0,0025 Proz. H_2SO_4) hatten keinen deutlich nachweisbaren Einfluſs, auch nicht nach längerem Stehen. Acidalbumin lieſs sich hierbei nicht nachweisen. Bei etwas gröſserem Zusatz von Säure (etwa 0,025 Proz.) wurde die Goldzahl nachweisbar erniedrigt auf 1,5 bis 3 (während sie vorher zwischen 3 bis 6 lag). Auch nach

*) Auch grobchemische Veränderungen der Eiweiſskörper können durch den zur Krystallisation nötigen Schwefelsäurezusatz hervorgerufen werden. So kann man zuweilen beobachten, daſs den ersten Fällungen so viel Schwefelsäure anhaftet, daſs die Lösungen derselben beim Stehen nach einiger Zeit gefällt werden. Es bildet sich Acidalbumin, welches durch das anhaftende Ammonsulfat gefällt wird. Erst mehrfach umgefällte Niederschläge geben Lösungen, die auch bei längerem Stehen keinen Niederschlag absetzen.

**) Die Lösung enthielt 3 Proz. Albumin.



24 Stunden bestanden dieselben Verhältnisse. Acidalbumin war ebenfalls noch nicht nachweisbar. Erst bei höherer Konzentration (0,25 Proz.) trat neben deutlicher Bildung von Acidalbumin eine stärkere Herabsetzung der Goldzahl, also Erhöhung des Wirkungswertes ein. (Goldzahl 0,3 bis 1,5.) Es wird sich lohnen, diese Verhältnisse später genauer zu verfolgen; vorläufig genügen diese Daten, um zu zeigen, dafs die hohe Goldzahl des krystallisierten Albumins nicht auf den Einflufs der bei der Krystallisation verwandten Säure zurückgeführt werden kann, denn die Wirkung der Schwefelsäure besteht gerade in einer Erniedrigung der Goldzahl.

Im Gegensatz zu verdünnter Säure wirkte verdünntes Alkali auf die Goldzahl des krystallisierten Eiweifs nach ganz kurzer Einwirkung verschlechternd ein und zwar so, dafs eine Goldzahl überhaupt nicht bestimmbar war; jedenfalls lag dieselbe über 30*). Die Versuche wurden ausgeführt mit einem Gehalt an NaOH von 0,004 Proz., 0,04 Proz. und 0,2 Proz.**). Die mit 0,004 Proz. und 0,04 Proz. NaOH versetzten Lösungen erwiesen nach zwei Tagen dasselbe Verhalten wie bei sofortiger Prüfung. Globulinlösung behielt ihre Goldzahl bei Zusatz von 0,2 Proz. Natriumhydroxyd.

Eine wesentliche Veränderung kann durch die Einwirkung **stärkerer** Natronlauge bewirkt werden, und zwar im Sinne einer Erniedrigung der Goldzahl. Während die letztere bei Globulin, sowie bei dem amorphen Albumin in der ursprünglichen Gröfsenordnung bleibt, wird beim krystallisierten Albumin eine totale Veränderung des ganzen Verhaltens herbeigeführt. Zusatz von 30prozentiger Natronlauge im Verhältnis von 8 ccm Eiweifslösung zu 2 ccm Natronlauge bewirkt ziemlich sofort eine wesentliche Erhöhung des Wirkungswertes, also Erniedrigung der Goldzahl, und zwar von 3 bis 6 auf 0,16 bis 0,4. Durch längere Einwirkung dieser Lauge (24 St.) wird die Goldzahl noch mehr erniedrigt, und zwar auf 0,005 bis 0,02, also auf einen Wert, der in derselben Gröfsenordnung liegt, wie die Goldzahl des Globulins,

*) Jedoch war das Verhalten wesentlich verschieden von solchen Lösungen, bei denen die Anwesenheit des „verunreinigenden Körpers“ die Bestimmung einer Goldzahl unmöglich machte; es trat keine direkte Fällung der Goldlösung (ohne Kochsalz), wie vorher (S. 151 dieser Abhandlung) beschrieben, ein.

**) Da die verwandten Albuminlösungen ammonsulfathaltig waren, so ist das wirksame Alkali bei den ersten Versuchen nicht verdünnte Natronlauge, sondern Ammoniak.

Ovomukoids, des amorphen Albumins, bezw. von deren Albuminaten*). Es läfst sich also der Satz aufstellen, dafs die Albuminate sämtlicher untersuchter Eiweifsstoffe des Eierklars annähernd die gleiche Goldzahl haben. Zwar sind geringe Unterschiede vorhanden, jedoch bewegen sich die Zahlen in derselben Gröfsenordnung. Wir haben die Beobachtung gemacht, dafs gerade bei der Bestimmung der Goldzahl der Albuminate unter den von uns eingehaltenen Bedingungen die Qualität der Goldlösung von allergröfstem Einflufs ist. Als wir eine Goldlösung benutzten, in der irrtümlich die doppelte Menge Gold enthalten war (die Lösung unterschied sich auch äufserlich durch starke Trübung und dunkel violettroten Farbenton), kamen wir bei den Albuminaten zu völlig abweichenden Ergebnissen, während dieselbe Goldlösung bei den nativen Eiweifsstoffen sich recht wohl benutzen liefs.

Die mitgeteilten Versuche haben uns zu der Überzeugung gebracht, dafs diejenigen Reagentien, welche dem Eiweifs zwecks fraktionierter Trennung zugesetzt wurden und den Fraktionen auch nachträglich noch anhaften, in den in Betracht kommenden Mengenverhältnissen keinen erheblichen Einflufs auf den Wert der Goldzahl ausüben.

---

*) Es sei besonders hervorgehoben, dafs die angeführten Goldzahlen der Albuminate bei Gegenwart des zur Albuminatbildung benutzten NaOH bestimmt wurden. Die Einwirkung des NaOH ist dabei sicher über die Albuminatbildung hinausgegangen, so dafs auch Albumosen, event. Peptone entstanden sind.

Die 0,5 bis 3proz. Lösungen (meist noch ammonsulfathaltig) wurden, mit 30prozentiger Natronlauge im Verhältnis 8 : 2 versetzt, gut gemischt; nach 24stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wurde die Goldzahl der Lösungen, die im wesentlichen Albuminat enthielten, bestimmt.

Zur Erläuterung diene folgende Zusammenstellung:

Albuminate aus	Goldzahl
Mercks Albumin 0,5 Proz.	0,008 — 0,04
Frischem Eierklar 0,5 Proz.	0,01 — 0,02
Fraktion II	0,008 — 0,04
Ovomukoid aus Fraktion II	0,01 — 0,04
Koagulum aus Fraktion II	0,006 — 0,036
Fraktion III	0,012 — 0,04
Globulin	0,012 — 0,04

C. IV. Ist das krystallisierte Eiweiſs im Eierklar vorgebildet?

Das eigentümliche Verhalten des krystallisierten Albumins zu starker Natronlauge ist für die Verwertung unserer Zahlen von Wichtigkeit. Es kann nach dem vorher Gesagten nicht bezweifelt werden, daſs dem krystallisierten Albumin ein sehr geringer Wirkungswert zukommt; es unterscheidet sich hierdurch von dem nicht krystallisierten Albuminanteil, sowie von den übrigen untersuchten Fraktionen des Eierklars. Bei Ovomukoid und Globulin ist dieser Unterschied ohne weiteres einleuchtend, anders ist es bei dem amorphen Albumin, dessen Goldzahl nicht direkt bestimmt wurde, da dasselbe in Fraktion II und Fraktion III mit Ovomukoid, bezw. noch anderen „verunreinigenden Körpern“ vorläufig ohne Denaturierung untrennbar vermischt ist.

Schon der Umstand, daſs Fraktion III (obschon sie nur zur Hälfte aus Ovomukoid, zur andern Hälfte aus amorphem, koagulablem Albumin bestand) annähernd den gleichen Goldschutz ausübte wie eine reine Ovomukoidlösung (eher noch etwas wirksamer war), weist darauf hin, daſs dem koagulablen Albuminanteil ein hoher Wirkungswert zukommt, und zwar ein etwas höherer als dem Ovomukoid. Jedoch ist dieser Beobachtung, in Anbetracht der Gröſse des als Goldzahl bezeichneten Zahlenintervalls, keine absolute Beweiskraft zuzuschreiben. Mehr Beweiskraft hat der Umstand, daſs eine Lösung von Fraktion III, falls man durch Kochen den koagulablen Albuminanteil entfernt, einen wesentlichen Teil ihrer Wirksamkeit einbüſst, was nicht der Fall wäre, wenn nur das so schwach wirksame krystallisierte Albumin oder ein Körper mit gleich schwacher Wirkung neben Ovomukoid vorhanden wäre.

0,15 Proz. Lösung von Fraktion III (dialysiert) ungekocht	
Lösung ccm	Farbenänderung der Goldlösung
0,02	Bl V.
0,04	0
gekocht *)	
0,06	(l) V
0,14	l P
0,2	0-P
1	0

*) Die Lösung enthielt nach dem Kochen noch 0,08 Proz. nicht koagulables Ovomukoid.

Ferner ist zu beachten, dafs erst nach Entfernen des koagulablen Eiweifs die Gegenwart des „verunreinigenden Körpers“ deutlich hervortrat, was ebenfalls darauf hinweist, dafs derselbe in der Gesamtfraktion III durch einen stark wirksamen Bestandteil verdeckt war.

Es ist demnach das krystallisierte Eiweifs offenbar von dem amorphen Albumin (Conalbumin) verschieden.

Es bleibt nun noch die Frage zu beantworten, ob das krystallisierte Albumin im Eierklar vorgebildet ist, oder ob es etwa durch den Prozefs der Krystallisation erst hervorgerufen wird.

Bekanntlich hat Gabriel früher die Vermutung ausgesprochen, dafs es sich bei der Krystallisation des Eieralbumins um einen Depolymerisationsprozefs handle, also um eine Verkleinerung des Eiweifsmoleküls unter dem Einflufs des Krystallisationsmittels. Dieser Vermutung fehlt bisher eine experimentelle Stütze.

Da die Goldzahl des krystallisierenden Albumins nicht an den Krystallen, sondern an deren Lösung bestimmt wurde und auch dann nicht verändert wurde, wenn aus dieser Lösung das Albumin in amorphem Zustande gefällt wurde, so ist es unwahrscheinlich, dafs der Krystallisationsprozefs das Verhalten gegen die Goldlösung beeinflufst.

Die Prüfung des Verhaltens gegen starke Natronlauge ermöglicht es, den Beweis zu erbringen, dafs ein Körper mit hoher Goldzahl analog dem krystallisierten Albumin im Eierklar schon vorgebildet ist.

Da durch Einwirkung starker Natronlauge nur die Goldzahl des krystallisierten Albumins wesentlich verändert wird, dieses Albumin aber nach Langstein, Osborne und Campbell zu etwa 50 Proz. des Gesamteiweifs aus dem Eierklar gewonnen werden kann*), so mufs auch bei dem Gesamteiweifs des Eierklars der Einflufs starker Natronlauge sich bemerkbar machen, falls das krystallisierende Albumin als solches im Eierklar vorgebildet ist. Dies ist in der That der Fall. Eine verdünnte Lösung von frischem Eierklar hat die Goldzahl 0,08 bis 0,15**). Wird eine derartige Lösung in der vorher beschriebenen Weise mit starker Natronlauge (8:2;

*) Daher den Hauptbestandteil des Eierklars ausmacht.

**) Das Weifse eines frischen Eies wurde auf das zehnfache Volum mit destilliertem Wasser verdünnt. Von dem entstehenden festen Gerinnsel (Keratinhäutchen, Ovomucin, Globulin) wurde abfiltriert; der Eiweifsgehalt der klaren Lösung bestimmt. Die Goldzahl ist etwas niedriger wie beim Merckschen Trockeneiweifs, was wohl darauf zurückzuführen ist, dafs stark wirksame Bestandteile des Eierklars (z. B. Globulin) bei der Darstellung des Merckschen Albumins ihre Löslichkeit verlieren.

s. vorher) behandelt, so geht die Goldzahl in 24 Stunden auf 0,01 bis 0,02 herab.

Das Mercksche Trockeneiweifs wurde ebenfalls zur Untersuchung dieses Verhaltens benutzt.

Dieses Präparat ist in seinem Verhalten zur Goldlösung so gleichartig, dafs es zur Prüfung jeder neuen Goldlösung auf ihren Wirkungswert von uns benutzt wurde. Wir verfügen also über eine grofse Anzahl von Bestimmungsreihen, auf deren ausführliche Wiedergabe hier verzichtet werden kann.

Das Ergebnis dieser Bestimmungen ist, dafs die Goldzahl des Merckschen Albumins zwischen 0,10 bis 0,3 liegt*).

Werden zu 8 Teilen Lösung von Mercks Albumin 2 Teile 30 proz. Natronlauge hinzugesetzt, so bleibt zunächst kurze Zeit die Goldzahl unverändert (0,1 bis 0,3); nach 24 Stunden ist dieselbe jedoch wesentlich erniedrigt und beträgt nur mehr 0,01 bis 0,03, bei längerem Stehen bleibt dieselbe konstant. Durch die eintretende Albuminatbildung ist ein schwach wirkender Bestandteil in derselben Weise beeinflufst worden, wie es beim krystallisierten Eiweifs be-

*) 0,5 g Merck sches Albumin wurden mit Wasser verrieben, die Lösung auf 100 ccm aufgefüllt. Hierbei hinterblieb ein unlöslicher Rückstand, der durch Filtration oder Sedimentieren abgetrennt wurde. Der unlösliche Rückstand betrug bei unserem Präparat 17 Proz. Das Präparat enthielt 12 Proz. Wasser, 2,75 Proz. Globulin, 55 Proz. Albumin, 10 Proz. Ovomukoid, also 70 Proz. lösliche Eiweifsstoffe.

Als Beispiel seien hier einige Goldzahlen tabellarisch zusammengestellt.

Kolloid	Au Nr.	Datum	Milligramm Kolloid (auf 10 ccm Goldlösung)				
			0,1	0,15	0,2	0,25	0,3
Mercks Albumin	82	6. Febr. 1902	V-l-Bl	—	0-Vr	—	0
	89	5. März „	Bl	V	0-P	P	0-P
			Bl	Bl-V	l-Vr		0-P
	90	14. „ „	l-Bl	—	0-P		00-P
	92	8. Juni „	Bl	l-v-Bl	V	l-P	0-P

Die im Gegensatz zum frischen Eierklar wenig scharfen Übergänge weisen auf einen störenden Einflufs hin, wie er früher für den „verunreinigenden Körper“ nachgewiesen wurde.

Die von Zsigmondy (l. c. pag. 709) beobachtete Erniedrigung der Goldzahl beim Kochen einer Lösung von käuflichem Albumin haben wir bei Anwendung frischer Lösungen von Mercks Albumin nicht wieder erhalten können. Es wurde damals eine durch längeres Stehen veränderte Lösung, die wahrscheinlich durch Zersetzung stärker alkalisch geworden war, benutzt.

In betreff der übrigen Goldzahlen sei nochmals auf S. 139 dieser Abhandlung, Absatz 4, verwiesen.



schrieben ist. Es ist demnach höchst wahrscheinlich im frischen Eierklar (bezw. Mercks Albumin) das krystallisierende Albumin vorgebildet und für die hier beschriebene Erscheinung verantwortlich.

3. Ergebnisse. Zusammenfassende Schlufsbetrachtungen.

Die wichtigsten Resultate der vorliegenden Untersuchung seien im folgenden kurz zusammengefafst.

1. Es wurde gezeigt, dafs die Goldzahl zur näheren Charakterisierung der Eiweifskörper Verwendung finden kann ähnlich wie andere chemische oder physikalische, zahlenmäfsig ausdrückbare Eigenschaften (Zusammensetzung, opt. Aktivität, Koagulationstemperatur), dass sie aber in bestimmten Fällen viel auffälligere Unterschiede erkennen läfst. Zur Übersicht diene beistehende

Zusammenstellung IV.

Untersuchtes Kolloid	Goldzahl
Globulin	0,02 — 0,05
Ovomukoid	0,04 — 0,08
Krystallisiertes Albumin	2 — 8
Fraktion III (amorphes Albumin und Ovomukoid)	0,03 — 0,06
Mercks Albumin	0,1 — 0,3
Frisches Eierklar	0,08 — 0,15

2. Das krystallisierte Albumin hat eine viel höhere Goldzahl, als die übrigen untersuchten Eiweifskörper.

3. Dasselbe wird leicht durch andere Eiweifskörper verunreinigt, die sich nur schwer durch Umkrystallisieren entfernen lassen. Das kolloidale Gold giebt uns ein einfaches Mittel an die Hand, um uns von der Gegenwart und ungefähren Beschaffenheit der Verunreinigungen zu überzeugen.

4. Diese Verunreinigungen (zugleich die Bestandteile der amorphen Fraktionen des Eieralbumins) sind Conalbumin, Ovomukoid und aufserdem ein als „verunreinigender Körper" von uns beschriebener Bestandteil, der sich von allen anderen untersuchten Proteinen des Eierklars dadurch unterscheidet, dafs er in der Goldlösung eine violette Trübung hervorruft und dadurch die Goldzahl unbestimmbar macht.

5. Die Albuminate sämtlicher untersuchter Eiweifskörper (einschliefslich des krystallisierten Albumins) haben annähernd die gleiche Goldzahl.

Kürzere Mitteilungen.

1. Eine automatische Pipette zum raschen Abmessen.

Von **Fr. N. Schulz.**

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Jena.)

Beistehend abgebildete Pipette (Fig. 1) erleichtert das rasche Abmessen bestimmter Flüssigkeitsmengen. Sie hat mir und Zsigmondy bei Bestimmung der Goldzahl gute Dienste geleistet. (Vgl. dieses Heft S. 139).

Die Pipette wird gefüllt durch Saugen an dem Gummischlauche. Sobald die Flüssigkeit in den engen Teil des inneren Rohrs einsteigt, hat man eine bestimmte Menge Flüssigkeit in dem äufseren Rohr, die nun durch Ausblasen entleert werden kann. Wird das innere Rohr, bezw. dessen Spitze eng genug gewählt, so stellt sich die Pipette automatisch ein, indem die Wandadhäsion in der Kapillare die Schwere der Flüssigkeit im äufseren Rohr überwindet. Ist die Schwere der Flüssigkeit im äufseren Rohr zu grofs, oder will man, etwa um ein momentanes Entleeren der Pipette zu ermöglichen, das innere Rohr nicht zu sehr verengern, so kann man den Abschlufs dadurch erzielen, dafs man den Schlauch, sobald die Flüssigkeit in das innere Rohr eingestiegen ist, mit den Zähnen zukneift.

Fig. 1.

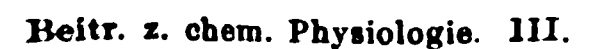
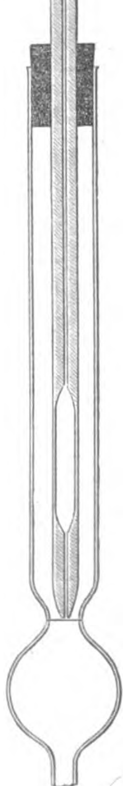


Fig. 2.



Durch Verschiebeu des inneren Rohres in dem abschliefsenden Gummistopfen kann man die Pipette mit Leichtigkeit auf jede bestimmte Flüssigkeitsmenge einstellen und dann durch Entleeren in ein Mefsgefäfs eichen. Falls man es vorzieht, an der Pipette eine Graduierung anzubringen, so darf das äufsere Rohr nicht in der gewöhnlichen Weise geeicht werden, sondern mufs für diesen bestimmten Zweck auf Ausflufs ausge-

messen werden, da das Einführen des inneren Rohrs eine Verschiebung des Meniskus bewirkt, wie aus umstehender Abbildung ersichtlich ist (Fig. 1).

Die Vorteile dieser Pipette bestehen einmal darin, dafs man wechselnde Mengen abpipettieren kann. Ferner erlaubt dieselbe ein wesentlich rascheres Arbeiten als die gewöhnlichen Pipetten. Besondere Vorteile hat man also dann, wenn es sich darum handelt, häufiger dasselbe Quantum abzumessen; z. B. wenn bei der Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl immer bestimmte Mengen Schwefelsäure abgemessen werden sollen, oder bei Phosphortitration immer bestimmte Mengen Acetatgemisch. Ich glaube jedoch, dafs diese Pipette allgemeiner Anwendung fähig ist da, wo es weniger auf Präzision als auf rasches Abmessen ankommt.

Wesentlich gröfsere Genauigkeit erzielt man, wenn man dem Instrument die in Fig. 2 abgebildete Form giebt; man mufs hierbei allerdings auf den Vorteil, wechselnde Mengen abpipettieren zu können, verzichten; höchstens kann man durch Anbringen von zwei Kugeln das Einstellen auf zwei verschiedene Mengen, etwa 5 ccm und 10 ccm, ermöglichen.

Ein ähnliches Prinzip wird schon benutzt zur Füllung von Büretten; als Pipette scheint mir das vorstehend beschriebene Instrumentchen neu zu sein, jedenfalls hat dasselbe keine Verbreitung *).

---

*) Die Firma A. Haak in Jena liefert das in Fig. 2 abgebildete Instrument, und zwar mit einer Kugel zu 5 ccm oder 10 ccm, sowie mit zwei Kugeln zu je 5 ccm. Das Instrument ist von der Firma Haak zum Musterschutz angemeldet.

VII.

Über das glykogenspaltende Ferment der Leber.

Von Doz. Dr. **Friedel Pick.**

(Aus dem pharmakologischen Institut der deutschen Universität zu Prag.)

Für eine Anzahl von Glykosurieen ist die Abhängigkeit ihres Auftretens vom Glykogengehalt der Leber erwiesen. Dieser Umstand hat dazu geführt, dieselben als durch Spaltung des Leberglykogens und Ausschwemmung des gebildeten Zuckers entstanden anzusehen; ein klarer Einblick in die feineren Vorgänge, die sich hierbei in der Leber abspielen, ist jedoch bislang nicht gegeben.

Die vielfachen, trotz zahlreicher Einwände immer wieder erneuerten Angaben über das Vorhandensein eines Glykogen in Zucker überführenden Fermentes in der Leber schienen die Möglichkeit zu eröffnen, durch das genauere Studium dieses Fermentes der Frage der Abhängigkeit jener Glykosurieen von der Fermentthätigkeit näher zu treten.

Wenngleich nun diese Hoffnung sich einesteils wegen der Schwierigkeit genauer quantitativer Vergleiche derartiger Fermentwirkungen, anderenteils darum, weil eine solche diastatische Fähigkeit nicht nur der Leber, sondern in mehr oder minder hohem Grade noch anderen Organen, insbesondere dem Blute zukommt, als trügerisch erwiesen hat, so gestatten die im nachfolgenden anzuführenden Versuchsreihen doch, zu der trotz vielfacher Bearbeitung unentschiedenen Frage nach der Existenz und insbesondere nach der Bedeutung des saccharifizierenden Leberfermentes für die intravitale Glykogenspaltung Stellung zu nehmen; eine Frage, die, wie auch Oppenheimer in seiner nach Ausführung meiner Versuche erschienenen Monographie der Fermente sagt, „im Dunkeln gelassen ist und dringend der Aufklärung bedarf“.

1.

Die Anschauung, dafs die Umwandlung des Leberglykogens in Zucker durch ein spezifisches Ferment erfolge, ist fast so alt wie die Entdeckung des Glykogens selbst. Bereits Claude Bernard gab an, dafs man dasselbe durch Wasser und Glycerin extrahieren und durch Alkohol fällen könne. Das wurde alsbald von Hensen und Wittich bestätigt, welch letzterer dann die Existenz dieses Fermentes auch für die vollständig ausgewaschene, blutleere Leber festhielt und gegenüber der Anschauung Tiegels verteidigte, wonach die in der Leber statthabende Saccharifizierung durch im Blute enthaltene Fermente bewirkt werden sollte. Kurze Zeit nachher untersuchten Ebstein und Müller den Einflufs verschiedener chemischer Agentien auf das Leberferment und fanden, dafs die Wirkung desselben durch Salze gar nicht beeinflufst wird, während Alkalien dieselbe verlangsamen und Säuren sie aufheben.

Im direkten Gegensatz zu allen diesen Autoren, welche das Ferment als ein vitales Agens auffassen, fand dann bei in E. Ludwigs Laboratorium ausgeführten Untersuchungen Abeles, dafs auch längere Zeit der Siedehitze ausgesetzte und nachher wiederholt mit starkem Alkohol behandelte Lebersubstanz unzweideutige saccharifizierende Eigenschaften besitzt, und schlofs daraus, dafs dieses saccharifizierende Ferment wohl als ein postmortales Produkt anzusehen sei. Diese Deutung wurde jedoch von Seegen und Kratschmer zurückgewiesen, obgleich sie im übrigen die Thatsache, dafs auch in gekochtem Leberbrei Saccharifikation nachzuweisen ist, bestätigten. Da sie nämlich fanden, dafs auch in dem durch Alkoholfällung erhaltenen Niederschlag aus dem Dekokte einer gekochten Leber nach Auflösung anfangs nur Glykogenreaktion, später aber auch deutliche Zuckerreaktion zu erhalten war, wiesen sie die Annahme einer postmortalen Bildung des Fermentes zurück, da das Dekokt nicht mehr in Berührung mit der Leber war. Dies, sowie der Umstand, dafs schon durch Wittich und Lépine in fast allen Körperorganen ein diastatisch wirkender Stoff nachgewiesen worden war, dessen Wirkung, wie Seegen und Kratschmer nachzuweisen glaubten, auch durch Kochen nicht verändert wird, führten diese Autoren dazu, reine Eiweifskörper in Bezug auf ihre Einwirkung auf Glykogenlösungen zu untersuchen, und in der That fanden sie, dafs Serumeiweifs, Eieralbumin und Kasein Glykogenlösungen energisch saccharifizierten, während das in Wasser unlösliche Fibrin diese Fähigkeit nicht aufwies. Durch Kochen der Lösungen der Eiweifskörper wurde die dia-

statische Wirkung momentan sistiert, trat aber nach zwei bis drei Tagen wieder auf. Dieselbe erwies sich qualitativ als mit jener des Speichel- und Pankreasextraktes identisch, stand ihr jedoch in Bezug auf Quantität und Schnelligkeit der Wirkung bedeutend nach.

Diese Anschauung, wonach Eiweifskörpern als solchen diastatische Wirkungen zukommen, ist übrigens für die pflanzlichen Fermente bereits von Baranetzki und Mulder geäufsert worden. Ähnlich jedoch wie die in den 60er Jahren vielfach vertretene Vorstellung, wonach allen tierischen Substanzen, jedoch nur im Zustande der Zersetzung, diastatische Fähigkeiten zukommen sollten, als durch Versuchsfehler bedingt erwiesen wurde (Foster), erfuhr auch diese Anschauung in neuerer Zeit eine gründliche Widerlegung durch Schwiening, der gelegentlich von Versuchen über Autodigestion der Organe nach der Methode von Salkowski fand, dafs der Zusatz von einigen Tropfen Chloroform das Auftreten von Zucker in Albuminglykogenlösungen vollständig verhindert, und dies auf die antibakteriellen Eigenschaften des Chloroforms zurückführte. Es wird dadurch wahrscheinlich, dafs in den Versuchen von Seegen und Kratschmer, die ohne antibakterielle Kautelen operierten, die Zuckerbildung auf Bakterieneinwirkung zu beziehen ist. Andernteils fand aber Schwiening auch, dafs Chloroformwasserextrakte gekochter Leber ebenfalls nach einiger Zeit Zunahme des Zuckergehaltes erkennen lassen, weshalb er in Übereinstimmung mit Abeles eine Neubildung des Leberfermentes aus den mit in Lösung übergegangenen Stoffen der Leber annehmen zu müssen glaubt. Im Gegensatze hierzu haben aber Pavy und Siau nach gründlichem Kochen keine weitere Zuckerbildung konstatieren können.

Während man in diesen Versuchen eine fermentative Thätigkeit als erwiesen ansah und nur die intravitale Existenz des Fermentes bestritt, wurde von anderer Seite die Saccharifikation des Glykogens nicht als Wirkung von Fermenten, sondern als Resultat der Thätigkeit der Zellen hingestellt. Zunächst haben genauere Untersuchungen der aus Glykogen entstehenden Zuckerarten gezeigt, dafs die Fermente das Glykogen in ein Gemisch von Dextrin und Maltose verwandeln (Bourquelot), was auch für das Leberferment von Eves behauptet, von Pavy, Paton, Bial und Tebb aber bestritten wird, wonach dieses Ferment nur Dextrose bildet. Da nach mehrfachen Angaben (Nasse, Seegen und Kratschmer, Külz) die in der Leber enthaltene Zuckerart Traubenzucker ist, haben Seegen und Kratschmer es für unzulässig gehalten, den

Leberzucker als durch Einwirkung einer Diastase auf Glykogen entstanden zu erklären. Seegen hat sich bekanntlich seither bemüht, die Herkunft des Leberzuckers aus Eiweifskörpern und Fett abzuleiten. Diese Annahme wurde von Bourquelot, Böhm und Hoffmann, Dastre, Girard vorwiegend unter Hinweis auf die ungenügende Beweiskraft der Seegenschen Versuche bestritten.

Dastre hat zunächst gefunden, dafs die Fermentwirkungen von Macerationsextrakten oder Dekokten der Leber bei genügender Sterilisation verschwinden, also wohl Effekt von Mikroorganismen sind, und dies auch unter Bedingungen, wo die Sterilisation Fermentwirkungen nicht aufheben würde (diskontinuierliche Sterilisation bei 55° C., Zusatz von 10 proz. Boraxlösung, Einwirkung bei 0°). Da er ferner fand, dafs Einwirkung von Eiskälte die Saccharifikation des Glykogens nicht verhindert, während dies in der überlebenden Leber der Fall ist, gelangte er zu dem Schlusse, dafs diese Saccharifikation nicht Wirkung eines Fermentes, sondern der Zellenthätigkeit sei.

Denselben Weg, nämlich Aufhebung der vitalen Thätigkeit bei Intaktlassung der fermentativen, haben noch andere Autoren eingeschlagen, jedoch mit ganz entgegengesetztem Resultate. So hat Salkowski gezeigt, dafs Chloroformwasser die Protoplasmawirkung aufhebt, die löslichen Fermente der Gewebe jedoch intakt läfst; bei der Anwendung auf die Leber fand sich bei Digestion mit Chloroformwasser totale Saccharifikation des Glykogens, welche nach vorhergehendem Eintragen der Leber in siedendes Wasser ausblieb. In ähnlichem Sinne wirkt nach Arthus und Huber eine 1 proz. Fluornatriumlösung; und auch diese Autoren fanden, dafs die Saccharifikation des Glykogens in einer Maceration von Leberbrei in Fluornatriumlösung prompt von statten geht, selbst wenn man das Leberbreifiltrat erst nach Wochen mit Glykogen zusammenbringt.

Während also die Resultate von Salkowski und Arthus und Huber für die Annahme eines fermentativen Prozesses und gegen Erklärung der Verzuckerung des Glykogens durch Zellthätigkeit sprechen, sind dieser letzteren Anschauung doch in neuerer Zeit wieder zwei Vertreter erstanden, die auf Grund zahlreicher Experimente dieselbe verteidigen, Noël Paton, dem es nicht gelang mittels Glycerin oder Kochsalzlösung wirksame Extrakte aus der Leber zu erhalten, und der bei Verwendung einer 1 proz. Fluornatriumlösung nach gleichen Zeiträumen immer mehr Glykogen

unverzuckert vorfand als bei Verwendung einer 0,75 proz. Kochsalzlösung, und Cavazzani.

Ein weiteres, ursprünglich von Noël Paton angeführtes Argument, dafs nämlich die prompte Verzuckerung in der überlebenden Leber an die Integrität der Zellen gebunden sei, hat sich bei einer Nachprüfung, die Paton infolge der Kritik Pavys unternahm, als durch einen Versuchsfehler bedingt erwiesen. Pavy, der in den sechziger Jahren gegenüber Claude Bernard die Saccharifikation des Glykogens als postmortalen Vorgang, bedingt durch ein beim Absterben der Leber frei werdendes Ferment, erklärt hatte, zeigte später, dafs auch die durch längeres Stehen unter Alkohol zur Gerinnung gebrachte Leber ihre zuckerbildende Fähigkeit behält, worin er einen absolut sicheren Beweis sah, dafs die Erscheinung der Verzuckerung nicht auf einem nur den lebenden Zellen zukommenden Stoffwechselvorgang beruht. Die Fermentwirkung wird durch Gefrierenlassen der Leber aufgehoben und durch Ätzkali sowie kohlensaures Natron gehemmt, während citronensaures Natron die Art der Glykogenveränderung zu beeinflussen scheint, indem das Reduktionsvermögen des gebildeten Zuckers erhöht wird. Die Frage, ob dieses Ferment auch im Leben eine Rolle spielt, kommt für ihn gar nicht in Betracht, da er ja bekanntlich eine Abgabe von Zucker an das Blut aus der Leber wenigstens als normalen Prozefs leugnet. Die Beweiskraft der Alkoholmethode Pavys in dem Sinne, dafs dadurch jegliche Protoplasmathätigkeit ausgeschaltet sei, ist nun von Paton bestritten worden mit der Begründung, dafs Albumine und Globuline erst nach längerer Einwirkung eines stärkeren Alkohols koaguliert werden. Paton fand in Versuchen, deren Beweiskraft jedoch wegen der geringen Menge der für die Einzelbestimmung verwendeten Leber (1 g der alkoholgefällten und getrockneten Substanz) zweifelhaft erscheint, dafs Behandlung der Leber mit Alkohol beim Kaninchen und Schaf die glykogenspaltende Fähigkeit aufhebt, beim Hunde und bei der Katze aber nicht. Dem gegenüber hat dann Tebb berichtet, dafs bei 40° getrocknete, dann zerriebene und nach $2^1/_2$ Monaten unter Alkohol gebrachte Leber nach weiteren 6 Monaten Stärke und Maltose in Dextrose zu verwandeln vermochte. Daraufhin hat in einer späteren Arbeit Paton das Bestehenbleiben der diastatischen Wirkung nach Alkoholeinwirkung zugegeben, jedoch auf Grund von vergleichenden Versuchen geleugnet, dafs dieses Vermögen der Leber in höherem Grade zukomme als dem Blut und der Niere.

Weiter verglich Paton die Glykogenabnahme in einem sechs Stunden überlebenden Leberstücke mit derjenigen, welche das Leberpulver nach Alkoholbehandlung in Glykogenlösungen in derselben Zeit zu erzielen vermochte. Er fand hierbei das letztere Pulver viel wirksamer. Auf diesen Punkt und die gegen Patons Versuche sich erhebenden Bedenken wird weiter unten bei der Mitteilung meiner eigenen noch einzugehen sein. Er untersuchte ferner die Einwirkung des Chloroforms, welches nach seinen Er-

fahrungen die Glykogenverzuckerung in der überlebenden Leber beschleunigt, auf das durch Alkoholfällung erhaltene Leberpulver und fand keine deutliche Beschleunigung; in zwei von fünf Versuchen schien sogar eine Verzögerung einzutreten. Dies alles führt Paton dazu, die fermentative Zuckerbildung in der Leber zu leugnen.

Zu demselben Resultate gelangte in mehreren Versuchsreihen Cavazzani, der früher aus dem geringen Zuckergehalte der Leber bei Säuglingen und dem Fehlen der diastatischen Eigenschaften des Blutes bei denselben gerade einen Parallelismus zwischen Fermentwirkung und Zuckerbildung erschlossen hatte, später aber fand, dafs das aus der Leber ausströmende Blut keine gröfsere saccharifizierende Wirksamkeit hat als das ihr zuströmmende, ferner, dafs die Reizung des Plexus coeliacus die Zuckermenge in der Leber steigert, ohne die Zirkulation in derselben zu ändern, wobei gleichzeitig die Leberzellen Strukturänderungen analog den in secernierenden Drüsen beobachteten zeigen. Sodann fand er das saccharifizierende Vermögen des Lebervenenblutes nach der Reizung in Bezug auf Verzuckerung von Stärke gar nicht oder nur ganz wenig erhöht, während der Zuckergehalt des Blutes bedeutend zunahm. Ebenso fand er die diastatische Wirksamkeit von Leberstückchen auf Stärke vor und nach der Reizung nicht geändert. Durch diese Versuche und eine ablehnende Kritik der entgegenstehenden Angaben glaubte Cavazzani die Lehre vom Leberfermente abgethan zu haben.

Nach den seitherigen Untersuchungen von Salkowski über die Autodigestion, welche neuerdings für die Bedeutung der Fermentwirkung eintraten, ist Cavazzani auf diesen Gegenstand zurückgekommen. Er schlägt hierbei wieder den von Dastre, Arthus und Huber, Salkowski betretenen Weg ein, die Entscheidung unter Bedingungen zu suchen, wo die vitale Thätigkeit der Leberzellen ausgeschaltet ist, und zwar verwendet er hierzu das Methylviolett, welches nach den Erfahrungen über seine antiseptische Wirksamkeit die Lebensphänomene des Protoplasmas hindert. Nachdem geeignete Versuche gezeigt haben, dafs die diastatische Wirkung des Blutes auf Stärke durch Zusatz von Methylviolett im Verhältnis von 1 : 1000 nicht beeinflufst wird, vergleicht er die nach mehrstündiger Digestion von Leberbrei mit Blut nachweisbare Zuckermenge bei einem normalen und bei einem solchen Hund, welchem intravenös Methylviolett injiziert worden ist. Die Zunahme an Zucker nach dem Tode findet er bei dem letzteren

Tiere viel geringer. In demselben Sinne verlaufen Versuche mit Leberstückchen von demselben Hunde, welche vor und nach Methylviolettinjektion exstirpiert wurden, sowie solche mit Digestion von Leberstückchen mit Blut unter Zusatz von Methylviolett. Aus diesen Versuchen schliefst Cavazzani, dafs die Verzuckerung des Glykogens nicht auf ein lösliches Ferment, sondern auf die Thätigkeit der Leberzellen zurückzuführen ist.

Diese Versuche Cavazzanis, die in den verschiedensten Punkten zum Widerspruche herausfordern, haben in jüngster Zeit eine eingehende Kritik von Bial erfahren, welcher die Hemmung der Leberzellenfunktionen durch Injektion von Methylviolett als nicht erwiesen erklärt, den Vergleich der vor und nach Methylviolettinjektion exstirpierten Leberlappen in Bezug auf sofortigen und späteren Zuckergehalt mit Rücksicht auf den dazwischen liegenden operativen Eingriff für nicht beweiskräftig hält u. a. m.

Dem wäre, wie ich glaube, noch hinzuzufügen, dafs die Versuche von Cavazzani auch durch die geringen Mengen von Leberbrei, welche er vielfach verwendet, zweifelhaft erscheinen; darauf ist es ja auch zurückzuführen, wenn er in dem einzigen Glykogenversuch, den er mitteilt, als Resultat der Einwirkung von 5 g Leberbrei auf 100 ccm einer $^1/_2$ proz. Glykogenlösung nach 24 stündigem Stehen im Brutofen eine kaum merkliche Fällung von Kupferoxydul beobachtet, während ich in entsprechenden Versuchen bereits nach vier Stunden fast alles Glykogen verschwunden sah. Für die vorliegende Frage kommt ferner auch in Betracht, dafs Cavazzani den Nachweis, dafs das Methylviolett die diastatischen Vorgänge nicht beeinflufst, nur für Hundeblut und Stärkekleister geführt hat, aber nicht für Glykogen und Leberextrakt. Ferner erscheint bei den Vergleichsversuchen zwischen zwei Tieren oder zwischen zwei Stücken derselben Leber vor und nach einem Eingriffe die blofse Bestimmung des ursprünglichen Zuckergehaltes und desjenigen, der nach einigen Stunden sich findet, ohne gleichzeitige Bestimmung des Glykogengehaltes nicht genügend beweiskräftig. Denn wenn Cavazzani dann bei Methylviolettinjektion weniger Zucker findet, braucht dies nicht auf einer Hemmung der Verzuckerung des Glykogens zu beruhen, sondern kann in einem geringeren Glykogengehalte des Leberstückes seinen Grund haben, wie dies nach den Erfahrungen über die rasche Beeinflussung des Glykogengehalts der Leber durch operative Eingriffe im Abdomen, namentlich für den Versuch mit Methylviolettinjektion nach Exstirpation eines Leberlappens wahrscheinlich ist.

Bial hat in jenem kritischen Aufsatze, der sich auch mit den Versuchen Cavazzanis beschäftigt, die enzymatische Natur der postmortalen Zuckerbildung vertreten, bezugnehmend auf seine früheren Arbeiten, in welchen er die entgegenstehenden

Versuche Seegens als unrichtig erwiesen, und gestützt auf die Erfahrung, dafs die Zuckerbildung in der Leber der Kraft des jeweilig wirkenden Lymphenzyms entspricht, das von ihm und Röhmann genauer studierte diastatische Enzym des Blutes und der Lymphe für die Zuckerbildung in der Leber verantwortlich gemacht hatte. In jüngster Zeit hat dann wiederum Monier, da alle seine Versuche, ein diastatisches Ferment aus Leberbrei zu gewinnen, negativ blieben, das Vorhandensein eines zuckerbildenden löslichen Fermentes in der Leber für unbewiesen und die Intaktheit der Leberzellen als unumgängliche Bedingung für die Umwandlung des Glykogens in Zucker erklärt.

Wie die vorstehende Übersicht lehrt, ist über die in Rede stehenden Fragen keine Einigung erzielt, ja sogar die Existenz und Wirksamkeit des Fermentes nicht allgemein als erwiesen anerkannt. Unter diesen Umständen dürfte die Mitteilung einiger Versuche nicht ohne Interesse sein, welche zunächst den Nachweis des Fermentes, weiter quantitative Bestimmung seiner Wirksamkeit, deren Beeinflussung durch verschiedene Substanzen und einen Vergleich der Wirksamkeit des Fermentes mit dem in der Leber postmortal eintretenden Glykogenschwund zum Gegenstande haben.

2. Methodisches.

Die Mehrzahl der Autoren, welche die Leber auf Ferment untersuchten, hat den zerhackten Leberbrei mit Alkohol gefällt, nach Entfernung des Alkohols den so erhaltenen Brei getrocknet und die fein gepulverte Masse entweder direkt Stärke- und Glykogenlösungen zugesetzt oder erst mit Wasser, Glycerin, sowie Salzlösungen extrahiert.

Wir verwendeten zur Extraktion nach dem Vorgange von Huber und Arthus das Fluornatrium, von welchem erstere wahrscheinlich gemacht haben, dafs es die vitalen Vorgänge in der Zelle aufhebt, die enzymatischen dagegen intakt läfst, und zwar in einer Lösung von 0,2 g Fluornatrium auf 100 g physiologische Kochsalzlösung, eine Konzentration, die auch nach meinen Erfahrungen Fäulnis hintanhält. Im einzelnen gestalteten sich die Versuche folgendermafsen:

Die lebenswarm entnommene Leber wurde von der Pfortader aus so lange mit Leitungswasser durchgespült, bis dieses aus den Lebervenen farblos abflofs, dann zerhackt und mit dem fünffachen Volumen 96 proz. Alkohols 24 oder mehr Stunden stehen gelassen, dann ab-

geprefst und das nach vorherigem Trocknen bei Zimmertemperatur oder bei 38° erhaltene Leberpulver mit der Kochsalz-Fluornatriumlösung ausgezogen. Die Extraktion wurde im Anfang bei 38° in gewöhnlicher Weise ausgeführt, bis ein gelegentlicher Versuch zeigte, dafs durch Schütteln des Gemisches während der Digestion die Wirksamkeit der Extrakte bedeutend gesteigert wird. (Der verwendete Schüttelapparat gestattete es, während der ganzen Zeit eine Temperatur von 38° einzuhalten.) Nach 24 stündiger Digestion wurde das Gemisch koliert, die abgeprefste Fermentlösung im Falle des Bedarfs filtriert und dann eine abgemessene Menge zu ebenfalls in Kochsalz-Fluornatrium gelöstem Glykogen zugesetzt. Vergleichsproben wurden stets auf ein gleiches Volumen gebracht.

Zur Bestimmung der Leistungsfähigkeit des Fermentes hat die Mehrzahl der Autoren den entstandenen Zucker nach einer der bekannten Methoden bestimmt, andere den Glykogenrückstand. Die Zuckerbestimmung durch Reduktionsmethoden hat den Vorteil der Einfachheit, dagegen den Nachteil, dafs sie die Zwischenstufen der Hydrolyse des Glykogens, welche, wie Achroodextrin, ebenfalls reduzieren, in ungleichmäfsiger Weise (s. darüber Neumeister, Lehrbuch, 2. Aufl., S. 80) mit bestimmt, wogegen die Alkoholfällung nach vorhergehender Enteiweifsung bei Festhalten einer Konzentration von etwa 90 Proz. das Achroodextrin nach den Untersuchungen Tebbs mit niederschlägt. Dementsprechend ist die durch Bestimmung der vor und nach Fermenteinwirkung vorhandenen, durch Alkohol gefällten Substanzen erhaltene Differenz vorwiegend auf Zucker zu beziehen, giebt also ein Mafs der Überführung von Glykogen in alkohollösliches Kohlenhydrat. Ich benutzte daher die Methode der Alkoholfällung.

Was die Glykogenbestimmung betrifft, so gelangte im Anfang die Brücke-Külzsche Methode, später auch die von Pflüger-Nerking zur Anwendung, beide mit gleichsinnigem Resultat. Natürlich war, da es sich um ein Extrakt der Leber handelte, das selbst mit Alkohol fällbare Bestandteile enthielt, auch eine Leerbestimmung des Extraktes notwendig, um den erhaltenen Betrag von der nach Einwirkung des Fermentes auf die Glykogenlösung verbleibenden Fällung in Abzug bringen zu können *).

*) Hierbei zeigte sich, dafs das Fluornatrium-Kochsalzextrakt der Leber eine geringe Menge eines Körpers enthält, der bei Salzsäure-Jodquecksilberkaliumzusatz nicht gefällt wird, wohl aber durch starken Alkohol. Dieser Körper zeigt weder Jodreaktion, noch reduzierende Eigenschaften. Die Biuretreaktion ergab ein zweifelhaftes Resultat. Das Blut enthält diesen Körper nicht, dagegen findet er sich auch in Extrakten der Niere. Auffallend war auch, dafs bei der Prüfung der Eiweifsfreiheit der Extrakte



3. Wirksamkeit des Fermentes.

Als erstes übereinstimmendes Ergebnis aller Versuche ist der Nachweis einer deutlichen Glykogenabnahme durch die Kochsalzfluornatriumextrakte der durch Alkohol gefällten Leber nach ein- bis vierstündigem Verweilen im Brutofen bei einer Temperatur von 38 bis 40° hervorzuheben.

Weiter ergab sich, dafs vorheriges Aufkochen der Fermentlösung ihre Wirksamkeit vollständig aufhebt. Als Beispiel sei nur folgender Versuch angeführt.

Versuch vom 16. Oktober 1899.

Hund von 8 kg wird getötet, der Leberbrei nach Zusatz des fünffachen Volumens Alkohol zwei Tage stehen gelassen, dann abgeprefst, der Rückstand von 120 g Gewicht mit 380 ccm einer 2 proz. Lösung von Fluornatrium-Kochsalz ausgezogen. Nach achtstündigem Schütteln wird das Extrakt abgepresst, wodurch 340 ccm Flüssigkeit erhalten wurden. Mit ihr wurden nachfolgende Proben aufgestellt und nach vierstündigem Verweilen im Brutofen, wie oben geschildert, behandelt.

I. 40 ccm Fermentlösung + 30 ccm Glykogenl.: Rückstand in Gramm: 0,330,
somit wurden gelöst: 0,066,

II. 80 ccm Fermentlösung + 30 ccm Glykogenl.: Rückstand in Gramm: 0,404,
somit wurden gelöst: 0,132,

III. 120 ccm Fermentlösung + 30 ccm Glykogenl.: Rückstand in Gramm: 0,429,
somit wurden gelöst: 0,247,

IV. 40 ccm Fermentlösung gekocht + 30 ccm Glykogenlösung digeriert und gefällt: 0,396 = 0,396,

V. 40 ccm Fermentlösung allein digeriert und gefällt: 0,140 }
VI. 30 ccm Glykogenlösung „ „ „ „ : 0,262 } = 0,402.

Die in Lösung gegangenen Mengen sind aus IV und V berechnet.

Vergleicht man in diesem Versuche den bei IV erhaltenen Wert (Rückstand in der gekochten Fermentlösung plus Glykogen nach vierstündigem Verweilen im Brutschrank) mit der Summe der Proben V und VI (Rückstand in der Fermentlösung selbst und Gewicht des zugesetzten Glykogens), so ergiebt sich eine Differenz von nicht mehr als 0,006 g, ein Wert, der innerhalb der Grenzen der Versuchsfehler liegt, so dafs im Einklang mit anderen

---

nach Salzsäure-Jodquecksilberkaliumfällung durch weiteren Zusatz von Jodquecksilberkalium sich häufig eine Trübung einstellte, welche zunächst den Verdacht einer ungenügenden Eiweifsfällung aufkommen liefs, was jedoch dadurch auszuschliefsen war, dafs sich diese Trübung, wie E. Pflüger (Pflügers Archiv 53, 492; vgl. auch Seegen, Die Zuckerbildung im Tierkörper, Berlin 1900, S. 7) schon vor langer Zeit festgestellt hat, bei Alkoholzusatz, lange bevor die Glykogenfällung eingetreten ist, vollständig löste

Versuchen, die ein ganz analoges Resultat lieferten, der Schlufs berechtigt erscheint, dafs durch Aufkochen die Fermentwirkung vollständig aufgehoben wird.

Zugleich lehrt obiges Versuchsprotokoll, dass die doppelte Fermentmenge genau doppelt so viel Glykogen spaltete, die dreifache dagegen nicht ganz das Vierfache. Eine Anzahl anderer Versuche gab annähernd das gleiche Ergebnis, wie die nachfolgende Tabelle lehrt:

Es führte Glykogen in Zucker über in 3 Stunden, die Wirksamkeit der einfachen Fermentmenge gleich eins gesetzt:

		die zweifache Fermentmenge:	die dreifache Fermentmenge:
4. Oktober	Rindsleber	$^{7}/_{4}$	$^{14}/_{4}$
16. „	Hundeleber	$^{8}/_{4}$	$^{15}/_{4}$
26. „	„	$^{8}/_{4}$	$^{9}/_{4}$
2. Dezember	„	—	$^{14}/_{4}$

Indessen stimmen diese Zahlen doch nicht genügend überein, um weitergehende Schlüsse zu gestatten.

Es erschien ferner wünschenswert, Vorstellungen über die Verteilung des Fermentes in der Leber zu gewinnen, um aus den vor und nach eventuellen Eingriffen in abgeschnittenen Leberlappen gefundenen Fermentwirkungen Schlüsse ziehen zu können.

Die bezüglichen Versuche wurden derart angestellt, dafs ein Teil der Leber abgeschnürt und sofort verarbeitet, der Rest nach einer Stunde dem Tiere entnommen und in gleicher Weise behandelt wurde. Die erhaltenen Werte wurden dann auf je 100 g Lebersubstanz berechnet.

9. Febr. Hund von $6^{1}/_{2}$ kg.	96 g Leber ergeben eine Glykogenverminderung, auf 100 g Substanz berechnet, von 0,346 %.
„ „ „ „ „	78 g nach 1 h entnommen ergeben eine Glykogenverminderung, auf 100 g Substanz berechnet, von 0,345 %.
8. März „ „ 14 kg.	159 g Leber ergeben eine Glykogenverminderung, auf 100 g Substanz berechnet, von 1,053 %.
„ „ „ „ „	225 g Leber nach 1 h entnommen ergeben eine Glykogenverminderung, auf 100 g Substanz berechnet, von 1,046 %.
9. April „ „ 4,6 kg.	96 g Leber ergeben eine Glykogenverminderung, auf 100 g Substanz berechnet, von 1,19 %.
„ „ „ „ „	100 g Leber nach 1 h entnommen ergeben eine Glykogenverminderung, auf 100 g Substanz berechnet, von 1,37 %.

Die Tabelle zeigt, dafs die Verteilung des Fermentes in der Leber eine ziemlich gleichmäfsige ist und dafs der experimentelle Eingriff gewifs zu keiner Fermentverminderung führt.

4. Vergleich der Fermentwirkungen verschiedener Gewebe.

Es ist seit langem bekannt, dafs auch Blut, Lymphe und zahlreiche Gewebe diastatische Wirkungen zeigen. Indessen liegen über die quantitativen Verhältnisse bei demselben Tiere keine präzisen Angaben vor, obwohl dies bei einer in Blut und Lymphe vorkommenden Substanz zur Beurteilung der Frage, inwieweit diese Fähigkeit einem bestimmten Organ in erhöhtem Mafse zukommt, von gewisser Bedeutung ist. Meine Versuche, bei denen Leber- und Nierenbrei sowie Blut in gleicher Weise zur Verarbeitung gelangten, ergaben, dafs in 3 Stunden gelöst wurden

von 100 g Blut . . . . . 0,31 g Glykogen
„ 100 g Lebersubstanz . 0,69 g „
„ 100 g Niere . . . . 2,37 g „

Einesteils ist hier die starke, vielleicht auf Adsorption des Ferments beruhende Wirkung der Niere auffallend, die ich auch noch in einem zweiten Versuche bestätigt fand, anderenteils zeigt sich, wie sehr diese beiden parenchymatösen Organe in Bezug auf ihren momentanen Fermentgehalt dem Blute überlegen sind, was jedenfalls dafür spricht, dafs es sich nicht, wie dies vielfach geäufsert wurde, bei ihnen einfach um eine ihrem Blutgehalt entsprechende Wirkung handle.

5. Beeinflussung der Fermentwirkung durch pharmakologische chemische Agentien.

Die vielfach bearbeitete Frage nach der Beeinflussung der Fermentwirkung durch Gifte hat für die Leberdiastase eine erhöhte Bedeutung, da hier mehrfach der Versuch gemacht wurde, durch Verwendung von Substanzen, welche die Leistungsfähigkeit der Organe, angeblich aber nicht jene der Fermente herabsetzen, eine Entscheidung für oder gegen die Fermenttheorie zu treffen. In meinen Versuchen gelangten mit Rücksicht auf die einschlägigen Angaben verschiedener Autoren (Nasse, Baum, Cavazzani u. s. w.) zur Anwendung: Glycerin (1 %), Salmiak (1 %), Cyannatrium (1:1000), Strychnin (1:10000), Methylviolett (1:10000), Atropin. sulfur., Chinin. muriat. neutr., Curarin. Hierbei war eine Wirkung eigentlich nur bei Chinin deutlich, wie nachfolgende Tabelle lehrt:

Von 0,806 Glykogen wurde in alkohollöslichen Zucker verwandelt durch

reines Ferment . . . . 0,447 g
bei Zusatz von Curarin 1:10000 . . 0,462 g
bei Zusatz von Cyannatrium 1:1000 . 0,449 g
bei Zusatz von Chinin 1:100 . . . 0,317 g

In einem zweiten Versuch wurde gespalten von 0,235 g Glykogen

durch reine Fermentlösung	0,125 g
bei gleichzeitigem Zusatz von Cyannatrium 1:600 . .	0,104 g
bei gleichzeitigem Zusatz von Methylviolett 1:1000 . .	0,106 g

Aus diesen und anderen übereinstimmenden Versuchen ergiebt sich, dafs, während die Mehrzahl der angewendeten Stoffe in der gewählten Konzentration indifferent zu sein scheint, dem Methylviolett eine leichte, dem Chinin eine deutlich hemmende Wirkung zukommt. Zur genaueren Sicherstellung habe ich beim Chinin die Wirkung steigender Konzentrationen geprüft.

Es wurden überführt in Zucker von 0,165 g Glykogen in 6 Stunden

durch reine Fermentlösung	0,165 g
bei Zusatz von 1/10 % salzsaurem Chinin	0,159 g
" " " 1/4 % " "	0,146 g
" " " 1/2 % " "	0,114 g

Diese Versuche sind deswegen von Bedeutung, weil gerade Chinin von Cavazzani verwendet wurde, um eine Entscheidung über die Auffassung der Glykogenhydrolyse als fermentativen oder vitalen Vorgang herbeizuführen. Da nämlich Chinin wohl die Protoplasmathätigkeit, aber nicht fermentative Vorgänge beeinflussen soll, hat Cavazzani Hunde durch intravenöse Injektionen von Chinin getötet und danach die Zuckermengen in der Leber entweder sofort oder nach einstündiger Digestion mit Blut bestimmt. Er fand dabei immer niedrigere Zahlen als bei Kontrolltieren und schliefst daraus, dafs Chininsulfat eine hemmende Wirkung auf die Glykogenumwandlung hat. Da Versuche mit Speichel und Blutserum ihm gezeigt hatten, dafs die diastatische Wirkung dieser Flüssigkeiten auf Stärke durch Chinin (0,9 Proz.) nicht gestört wird, sieht er in diesen Versuchen, wie auch in den früheren mit Methylviolett einen Beweis dafür, dafs die Glykogenumwandlung in der Leber nicht Folge der Fermentwirkung, sondern der Zellenthätigkeit ist. Es ist aber zu bedenken, dafs die Unfähigkeit des Chinins, auf die Umwandlung von Stärkekleister durch Speichel und Blutserum einzuwirken, a priori noch nicht einen Analogieschlufs auf die Glykogenumwandlung durch das Leberferment gestattet, und die obigen Zahlen scheinen doch auf die Möglichkeit einer gewissen Hemmung dieses Vorganges hinzuweisen.

6. Vergleich der Fermentwirkung mit der postmortalen Zuckerbildung in der Leber.

Zur Beurteilung der Frage, ob dem saccharifizierenden Leberferment eine Bedeutung für vitale Vorgänge zukommt, oder dasselbe

nur als ein postmortal frei werdendes Produkt anzusehen ist, erscheint es notwendig, festzustellen, wie sich quantitativ die Wirkungen des Fermentes zu der Umwandlung des Glykogens in Zucker verhalten, welche bekanntlich in der Leber sofort nach dem Tode einsetzt.

Wie ich später gesehen habe, hat Noël Paton in seiner letzten Arbeit, in welcher er die Existenz des saccharifizierenden Leberfermentes zugiebt, analoge Versuche mitgeteilt, welche regelmäfsig eine stärkere prozentische Umwandlung des Glykogens durch die mit Alkohol behandelte Leber ergaben, als sie das Organ unmittelbar nach dem Tode zeigt. Meine Versuche verliefen in gleichem Sinne.

Am 2. März 1901 werden die Lebern von 3 Hunden nach dem Zerhacken in der Fleischmaschine möglichst gut gemischt. Gesamtgewicht 1900 g. Davon werden 960 g sofort nach Külz verarbeitet und in 100 g finden sich 1,052 Glykogen; 450 g werden mit ebenso viel Kochsalz-Fluornatrium 4 Stunden im Brutofen gehalten und 100 g enthalten 0,453 Glykogen, d. h. geschwunden 0,599 g Glykogen. 490 g, 3 Tage unter Alkohol gehalten, liefern eine Fermentlösung, welche in 4 Stunden pro 100 g Leber 0,763 Glykogen spaltet.

Es zeigt sich demnach auch in diesem Versuche, dafs die Wirksamkeit der Fermentlösung vollständig ausreichend ist, um den postmortalen Glykogenschwund zu erklären, wobei noch zu bedenken ist, dafs nach den Untersuchungen Bials und Noël Patons die Wirksamkeit solcher Fermente durch die Alkoholbehandlung in nicht unerheblichem Grade abgeschwächt wird. Die Anstellung mehrerer derartiger Versuche lehrte aber noch, dafs ein Parallelismus zwischen postmortaler Glykogenlösung und Fermentwirksamkeit für den einzelnen Fall nicht immer besteht. Insbesondere scheint bei geringem Glykogengehalt der Leber der postmortale Glykogenschwund viel geringfügiger zu sein, auch wenn sich das Extrakt der Alkoholleber als ziemlich kräftig erweist.

So konnte ich in einem Falle, in welchem die Leber sofort nach der Herausnahme nur 0,287 Proz. Glykogen nach der Külzschen Methode lieferte und nach 3stündiger Digestion, sowohl nach der Külzschen als nach der Pflügerschen Methode untersucht, noch fast genau denselben Wert ergab, wo also nahezu kein Glykogenschwund nachzuweisen war, für das Fermentextrakt der Alkoholleber eine Wirksamkeit feststellen, die sich für 100 g Leber auf rund 1 g Glykogen berechnet.

Übrigens läfst sich den Zahlen, die Noël Paton bei seinen 5 Versuchen erhielt, Ähnliches entnehmen. Denn auch er fand in 2 Fällen den postmortalen Glykogenschwund sehr gering, nämlich nur zu 10 Proz.

des anfänglichen Glykogenwertes, während die zugehörigen Fermentwirkungen 49 Proz. der mit der Alkoholleber zusammengebrachten Glykogenmengen betrafen.

Es zeigt sich also, dafs den aus der Leber nach Alkohol behandlung erhaltenen Fermentlösungen Glykogen spaltende Fähigkeiten ganz wohl in jenem Umfange zukommen, wie sie die postmortale Glykogenumwandlung in der Leber erfordert, und es steht somit a priori nichts im Wege, diesem Ferment eine Beziehung zu dem postmortalen Glykogenschwunde zuzuweisen.

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, ist die Beziehung des postmortalen Glykogenschwundes zu der intravitalen Glykogenumwandlung durchaus kontrovers, indem Autoren, welche die intravitale Spaltung als eine enzymatische ansehen, wie Salkowski, Richet u. s. w., andere gegenüberstehen, welche die Auffassung vertreten, dafs es sich dabei nur um vitale, an die Lebensthätigkeit der Zelle geknüpfte Vorgänge handelt (Paton, Cavazzani, Neumeister). Mir will es scheinen, als ob die von beiden Seiten nachhaltig geführte Diskussion eigentlich doch nur ein Streit um Worte sei, hervorgerufen durch den Umstand, dafs wir aus der Zeit minderer Erkenntnis her gewohnt sind, uns vorzustellen, dafs die fermentativen Vorgänge sich immer nur nach Absonderung der Fermente aus den Zellen in Hohlräume abspielen. Indessen lehren die Ergebnisse biochemischer Untersuchungen der letzten Zeit immer mehr, eine wie grofse Rolle intracellulären Fermenten für die vitalen Vorgänge zukommt, und während noch vor vier Jahren Neumeister sagen konnte, „wir müssen demnach vorläufig daran festhalten, dafs bei den Tieren ausnahmslos die cellulare Verdauung ohne Enzyme lediglich durch eine eigenartige Thätigkeit des lebenden Protoplasmas zustande kommt“, äufsert sich Hofmeister jüngster Zeit dahin, dafs man möglicherweise darauf rechnen könne, früher oder später für jede vitale chemische Reaktion ein zugehöriges, spezifisch auf diese abgestimmtes Ferment ausfindig zu machen. Von diesem Standpunkt aus, wonach die Fermente das wesentliche chemische Handwerkszeug der Zelle darstellen, verflüchtigt sich aber auch der ganze, so scharf betonte Gegensatz zwischen der enzymatischen und der rein vitalen Deutung eines Vorganges, wie die in Rede stehende Verzuckerung des Glykogens in der Leber.

Wir werden demnach dazu geführt, das, was wir als Ferment bezeichnen, einfach als eine Substanz anzusehen, welche, in den Leberzellen vorhanden und im Leben wirksam, aus der abgetöteten Zelle

unter Erhaltung ihrer Wirksamkeit extrahierbar ist. Von diesem Gesichtspunkte erklären sich unschwer auch die verschiedenen über das Ferment vorliegenden Beobachtungen. Die Versuche Cavazzanis, der nach Methylviolett- oder Chinininjektion die Verzuckerung abgeschwächt findet, sind da, wofern sie sich bestätigen und ihre Voraussetzung, dafs diese Stoffe Fermentwirkungen gar nicht beeinflussen, wirklich richtig ist, was nach meinen oben mitgeteilten Versuchen zweifelhaft erscheint, kein ausreichender Gegengrund. Denn es ist sehr wohl verständlich, dafs ein Gift, welches in dem zellfreien Extraxte das Ferment unbeeinflufst läfst, in dem so kompliziert gebauten Zellleibe Veränderungen herbeiführt, welche die Einwirkung des Fermentes auf das Glykogen beeinflussen. Umgekehrt liegen die Dinge bei Cavazzanis Versuch der Reizung des Plexus coeliacus, bei dem der Zuckergehalt des Blutes in den Venae hepaticae vermehrt ist, die diastatische Kraft des Blutes aber dieselbe bleibt. Ganz abgesehen von den Einwänden technischer Natur, welche Bial gegen diesen Versuch erhebt, erscheint derselbe ganz wohl verständlich im Lichte einer Anschauung, welche an Stelle der „erhöhten Lebensthätigkeit der Zelle“, die Cavazzani dadurch bewiesen sieht, den präziseren Begriff einer gesteigerten Wirksamkeit des intracellulären Fermentkomplexes annimmt.

In direktem Gegensatze zu der wohl zuerst von Salkowski klar ausgesprochenen Anschauung, wonach die Enzyme im Protoplasma der Zellen vorgebildet sind, stehen die noch in jüngster Zeit geäufserten Meinungen anderer Forscher, wonach die Fermente nicht in den Geweben enthalten, sondern in den Säften gelöst sind (Bial, Röhmann, Neumeister). Bial hat, wie eingangs erwähnt, das diastatische Ferment des Blutes und der Lymphe zum Gegenstand eingehender Untersuchungen gemacht. Er glaubte zunächst demselben eine Sonderstellung gegenüber den übrigen im Körper nachweisbaren diastatischen Fermenten darum zuweisen zu können, weil es Stärke nicht in Maltose und Dextrin, sondern in Dextrose umwandelt. Diese Anschauung, welcher auch schon ältere Angaben von Mering und anderen gegenüberstanden, wonach Maltose durch Speichel und Pankreas in Dextrose gespalten wird, erfuhr eine gewisse Korrektur durch eine weitere unter Röhmanns Leitung ausgeführte Arbeit (Hamburger), wonach es sich nicht so sehr um eine spezifische Eigentümlichkeit des Blut- und Lymphfermentes als vielmehr um quantitative Unterschiede handelt, indem das Blut weniger Diastase als Speichel und Pankreas, aber mehr Glukase enthält. Bial hat sich nun bemüht, das diastatische Blut-

und Lymphenzym als Ursache der Zuckerproduktion der Leber nachzuweisen, und stützt sich dabei zunächst auf die von ihm angenommene spezifische Eigentümlichkeit der Dextrosebildung durch das Ferment, da ja der Leberzucker als Dextrose erkannt ist, weiter auf Versuche mit Digestion von Leberbrei mit verschieden fermentreichem Blute, bei denen sich ein Parallelismus zwischen der Zuckerbildung und dem Wirkungsgrade des zugesetzten Blutes herausstellte. Für die hier diskutierte Frage, ob das Enzym seinen Sitz in der Leberzelle hat oder nur im Säftestrom, beweisen diese beiden Punkte nichts. Der erstere, da er sich durch die Untersuchungen Hamburgers als nicht spezifisch verwertbar herausgestellt hat, der zweite, weil der Leberbrei auch ohne Blut Zucker bildet und die Hinzufügung fermenthaltigen Blutes ja gewiſs erhöhend wirken muſs. Weiter haben dann Röhmann und Bial gezeigt, daſs unter Anwendung der Heidenhainschen Lymphagoga erster Ordnung: Peptoninjektion, Stauung der Vena cava u. a., die Stärke des diastatischen Blutenzyms zwar dieselbe bleibt, dagegen die des zuckerbildenden Lymphfermentes stark in die Höhe geht, und die Vermutung ausgesprochen, daſs es der gröſsere oder geringere Gehalt der Lymphe an diastatischem Ferment ist, welcher eine gröſsere oder geringere Saccharifikation von Glykogen in der Leber zur Folge hat. Die Zuckerbildung, welche in der Leber unter dem Einflusse von Zirkulationsstörungen auftritt, sowie die Glykosurie nach Piqûre, würden sich danach durch Änderungen in der Lymphbildung erklären. Bial hat dann in jüngster Zeit in seinem kritischen Artikel alle diese Momente wieder zusammengestellt und auch die schon Claude Bernard bekannte Thatsache der Zuckerbildung in der völlig entbluteten Leber in dem Sinne gedeutet, daſs bei der Durchspülung die fermentführende Gewebslymphe zurückbleibt. Er gelangt zu dem Schlusse, daſs die Annahme einer enzymatischen Umwandlung des Glykogens durch das diastatische Blut- und Lymphferment für die überlebende Leber nach allen Richtungen bewiesen erscheine und auch die einfachste und ungezwungenste Erklärung für die Mechanik der Zuckerbildung in der Leber des lebenden Tieres bilde.

Mir will es scheinen, als ob diese Anschauung, wonach das Ferment nicht einen Bestandteil der Zelle bildet, sondern nur in den Gewebssäften an ihr vorbeipassiere, denn doch nicht so mit den Thatsachen übereinstimme, wie Röhmann und seine Schüler annehmen, und auch für die überlebende Leber nicht so bewiesen sei, wie dies Bial hinstellt. Es sei hier ganz abgesehen von der

a priori nicht zu entscheidenden Frage, ob eine energische Wasserdurchspülung von der Vena portae aus nicht auch die Gewebsspalten ausspült. Jedenfalls scheinen mir die quantitativen Verhältnisse der diastatischen Wirksamkeit gegen eine solche Auffassung zu sprechen. Vergleicht man nämlich die diastatische Wirksamkeit des Blutes mit jener der Organe, so zeigt sich (vgl. Vers. S. 12), dafs der Fermentgehalt in der Leber weitaus gröfser ist, als wenn das ganze Organ zu 100 Prozent Blut enthalte. Dies beweist zunächst noch nichts gegen die angenommene Bedeutung der Lymphe, allein: 1. fanden Röhmann und Bial in der Norm die diastatische Wirkung der Lymphe aus dem Ductus thoracicus geringer als die des Blutserums, 2. haben wir keinen Anlafs, der Lymphe in der Leber eine besondere Beschaffenheit im Sinne eines gesteigerten Fermentgehaltes zuzuschreiben, sonst kämen wir auch auf dem Boden der Anschauung von Röhmann und Bial dazu, eine spezifische, die Fermentkonzentration steigernde Eigenschaft der Lymphendothelien anzunehmen.

Alle diese Momente scheinen mir gegen den Versuch zu sprechen, die saccharifizierenden Eigenschaften der Gewebe nur auf ihren Gehalt an Lymphe zu beziehen, somit das Ferment nur in die Gewebssäfte und nicht in das Protoplasma der Zellen zu verlegen.

Ferner kommt hier auch noch die Frage nach der Herkunft des Ferments in Betracht. Die seinerzeit vornehmlich von Schiff vertretene Anschauung, dafs das Erscheinen des diastatischen Fermentes das erste Symptom für das Absterben des Blutes sei, und die Behauptung von Tiegel und Plósz, dafs sich das diastatische Ferment des Blutes erst im Blute selbst durch einen Zerfall von roten Blutkörperchen bilde und nur während ihrer Zerstörung seine Wirksamkeit entfalte, sind durch neuere Untersuchungen, namentlich von Bial, als widerlegt anzusehen, und wenigstens für die Lymphe ist durch einen Versuch von Röhmann — Glykogeninfusion in ein Lymphgefäfs der Pfote und Bestimmung des Zuckergehalts in der Thoracicuslymphe — nachgewiesen, dafs innerhalb der Lymphgefäfse eine Umwandlung von Glykogen in Zucker erfolgt. Allein über den Ort, woher das Ferment in Blut und Lymphe stammt, ist Sicheres nicht bekannt. Neumeister meint, dafs sowohl das Leberferment wie das im Blut, in den Muskeln und im Harn aufgefundene offenbar aus dem Pankreas oder den Speicheldrüsen stamme, in der Form seines Zymogens zur Resorption gelange, physiologisch bedeutungslos und offenbar auf dem Wege der Ausscheidung aus dem Organismus begriffen sei.

Diese Anschauung erschien einer experimentellen Kontrolle zugänglich, indem danach bei einem pankreaslosen Tiere eine Abnahme des Fermentgehaltes der Lymphe zu erwarten wäre. Ein bezüglicher Versuch an einem Hunde, der am achten Tage nach totaler, von starker Glykosurie gefolgter Pankreasexstirpation bei anscheinend vollem Wohlbefinden getötet wurde, erwies die diastatische Kraft des Blutes und der Lymphe als durchaus normal. Wenngleich dieser Versuch, da ja die Speicheldrüsen erhalten waren, nicht absolut beweisend erscheint, so ist er doch mit der Annahme, dafs das diastatische Ferment aus dem Pankreas stamme, nicht gut verträglich.

Gegen die a priori ja ziemlich plausible Ansicht Neumeisters sprechen aber auch noch die Differenzen, welche sich bei einem Vergleich der Wirksamkeit zwischen Blut und Lymphe einerseits, Speichel und Pankreas andererseits ergeben. Während nämlich die letzteren als Endprodukte der Saccharifikation vorwiegend Dextrin und Maltose ergeben, liefert das Blut- und Lymphferment der Hauptmasse nach Dextrose. Dieser Unterschied ist so auffallend, dafs Bial, wie eingangs erwähnt, darin eine spezifische Eigentümlichkeit des Blut-Lymphferments sah. In Übereinstimmung mit älteren Angaben von v. Mering und anderen hat allerdings ein anderer Schüler Röhmanns, Hamburger, seither gezeigt, dafs es sich eigentlich um quantitative Unterschiede handle, indem hier wie beim Malzextrakt 2 Enzyme wirksam sind: Diastase und Glukase, richtiger gesagt Maltase, welche das von der Diastase gebildete Dextrin und die Maltose in Traubenzucker umwandelt. Diese beiden Enzyme sind nun in den verschiedenen Flüssigkeiten in ungleicher Menge enthalten, so dafs Speichel und Pankreassaft mehr Diastase, das Blut hingegen mehr Glukase enthält. Das Reduktionsmaximum beträgt nach Hamburger beim Speichel 0,31, beim Pankreas 0,36, beim Blut hingegen 0,80. Diese Differenz ist etwas zu grofs, um das Blut- und Lymphferment einfach, wie dies Neumeister will, als durch Resorption aus dem Pankreas und den Speicheldrüsen stammend anzusehen, und man wird, wofern man nicht eine Einfuhr vom Darmkanal annehmen will, dazu geführt, den Ursprung dieses Ferments in anderen Geweben als den Speicheldrüsen und dem Pankreas zu suchen. Hier kommt als dasjenige Organ, in welchem die stärkste Dextrosenbildung, also intensivste Maltasenwirkung nachgewiesen ist, vor allem die Leber in Betracht und so führen auch diese Überlegungen dazu, das diastatische Ferment nicht so sehr in die Gewebssäfte als in die Zelle selbst zu verlegen.

Litteratur.

Abeles, Beitrag zur Lehre von den saccharifizierenden Fermenten, Wiener mediz. Jahrbücher 1876, II.

Arthus und Huber, Ferments solubles et ferments figurés. Arch. de physiologie 1892, p. 651.

Baranetzki, Die stärkeumbildenden Fermente in den Pflanzen, Leipzig 1878, cit. nach Oppenheim.

Bernard Claude, Critique expérimentale sur la fonction glycogénique du foie. — Compt. rend. de l'académie des sciences V. LXXXIV, 1877.

Bial, Über das diastatische Ferment des Blut- und Lymphserums. Pflügers Arch. 52.

Ders., Weitere Beobachtungen über das zuckerbildende Blutferment. Ebenda 53, 156.

Ders., Weiterer Beitrag zum Chemismus des diastatischen Blutfermentes. Ebenda 54, 72.

Ders., Über die Beziehungen des diastatischen Fermentes des Blutes und der Lymphe zur Zuckerbildung in der Leber. Ebenda 55, 434.

Ders., Ist die Zuckerbildung in der Leber Funktion diastatischer Enzyme oder vitaler Thätigkeit der Leberzellen. Du Bois' Arch. 1901, S. 247.

Böhm uud Hofmann, Über die postmortale Zuckerbildung in der Leber. Pflügers Arch. 23.

Bourquelot, Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose. Journal del'anatomie et de la physiologie 1886.

Ders., Sur les caractères de l'affaiblissement eprouve par la diastase sous l'action de la chaleur. Compt. rend. 104, 576.

Cavazzani und Fratelli, Sulla fonzione glicogenica del fegato. Annali di chimic. e pharmacol. 1894.

Dies., A proposito dei nervi glicosecretori. Gazzetta degli Ospedali 1894.

Cavazzani, Über die Veränderungen der Leberzellen während der Reizung des Plexus coeliacus. Pflügers Arch. 1894.

Ders., Sul meccanismo della transformazione del glicogenio in glucosio nell' organismo. Annali di chimic. e pharmacol. 1894.

Ders., Sul meccanismo u. s. w. Daselbst 1897.

Ders., Über den Mechanismus der Zuckerbildung in der Leber. Du Bois' Arch. 1899.

Dastre, Recherches sur les ferments hépatiques. Arch. de physiol. normale et pathologique 1888.

Ebstein, W., u. J. Müller, Ber. d. d. chem. Gesellsch. VIII, 679.

Eves, Some experiments on the liver ferments. Journal of physiology V, p. 343.

Foster, Notes on amylolytic ferments. Journal of anatomy and physiology I, p. 107 (1867).

Girard, Über die postmortale Zuckerbildung in der Leber. Pflügers Arch. 41.

Hamburger, Vergleichende Untersuchung über die Einwirkung des Speichels, des Pankreas und des Darmsaftes sowie des Blutes auf Stärkekleister. Pflügers Arch. 60, 543.

Hofmeister, Fr., Die chemische Organisation der Zelle. Braunschweig 1901, S. 14.

Külz, Pflügers Arch. 24.

Lépine, Über Entstehung und Verbreitung des tierischen Zuckerfermentes. Ber. d. k. sächs. Gesellsch. d. Wiss. 1870.

Monier, Recherches physiologico-chimiques sur une fonction du foie. Laborat. de Biol. de Liège 1901. Cit. nach Centralbl. f. Physiol. 1901, p. 730.

Mulder, Chemie des Bieres. Leipzig 1858, cit. nach Oppenheim.

Nasse, Bemerkungen zur Physiol. der Kohlenhydrate. Pflügers Arch. 14, 479.

Neumeister, Lehrbuch der physiol. Chemie. 2. Auflage 1897, S. 132 bis 137 und 320.

Oppenheim, Die Fermente.

Paton, A further study of hepatic glycogenesis. Journ. of physiol. 22, 121.

Ders., Some observations on the mode of conversion of glycogen to glycose in the liver. Journ. of physiology 24, 36.

Pavy, Die Physiologie der Kohlenhydrate. Übersetzt v. Grube 1895.

Ders., On hepatic glycogenesis. Journ. of physiol. 22, 391.

Ders. und Siau, Über die Frage der Zuckerbildung in der erhitzten Leber. Journ. of physiol. 27, 457 (1902).

Pflüger und Nerking, Eine neue Methode zur Bestimmung des Glykogens. Pflügers Archiv 76.

Plosz und Tiegel, Über das saccharifizierende Ferment der Leber. Pflügers Archiv 7, 391.

Richet, De la diastase uréopoétique. Compt. rend. de la soc. de biol. 1894, p. 523.

Röhmann, Zur Kenntnis des diastatischen Fermentes der Lymphe. Pflügers Arch. 52, 158.

Röhmann u. Bial, Über den Einfluſs der Lymphagoga auf die diastatische Wirkung der Lymphe. Pflügers Arch. 55, 419.

Salkowski, Kleinere Mitteilungen. Pflügers Arch. 56, 351.

Ders., Über die Autodigestion der Organe. Festschrift für v. Leyden. 1891, S. 90.

Schiff, Untersuchungen über die Zuckerbildung in der Leber. Würzburg 1859, S. 16.

Schwiening, Über fermentative Prozesse in den Organen. Virchows Arch. 136, 444.

Tebb, Hydrolysis of glycogen. Journ. of physiol. 22, 429.

Tiegel, Über eine Fermentwirkung des Blutes. Pflügers Arch. 6, 391.

Wittich, Weitere Mitteilungen über Verdauungsfermente. Pflügers Archiv 3, 339.

Ders., Über das Leberferment. Daselbst 7, 28 (1873).

VIII.

Beiträge zur Kenntnis der physiologischen Beziehungen der schwefelhaltigen Eiweifsabkömmlinge.

Zweite Mitteilung.

α-Thiomilchsäure, ein Spaltungsprodukt der Keratinsubstanzen.

Von **E. Friedmann.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

α-Thiomilchsäure ist von Suter*) in einer aus Hornspänen stammenden Tyrosinmutterlauge gefunden worden. Diese Mutterlauge hatte alkalische Reaktion, besafs einen unangenehmen Fäulnisgeruch und zeigte auf ihrer Oberfläche reichliche Vegetationen von Schimmelpilzen. Die Thiomilchsäure wurde aus ihr durch Fällen mit Quecksilberchlorid isoliert und nach einer von Suter ausgearbeiteten Methode als Benzylthiomilchsäure mit synthetisch dargestellter Benzylthiomilchsäure identifiziert. Farbenreaktionen der freien Säure, Schmelzpunkt, Analyse und Eigenschaften der Benzylverbindung stimmen so völlig zu den Angaben, die über die entsprechenden synthetisch erhaltenen Produkte vorliegen, dafs nicht daran zu zweifeln ist, dafs es thatsächlich α-Thiomilchsäure war, was Suter erhalten hatte. Jedoch gelang es ihm bei Wiederholung des Versuches nicht, weder aus frischen Tyrosinmutterlaugen noch aus durch Zusatz von faulem Pankreas zur Fäulnis gebrachten Tyrosinlaugen Thiomilchsäure zu erhalten. Auf Grund dieser negativen Resultate hielt er sich für berechtigt, anzunehmen, dafs die α-Thiomilchsäure kein primäres Spaltungsprodukt der Eiweifssubstanzen sei, und dieser Befund gab wiederum Baumann**) Veranlassung, auf die nahe Beziehung hinzuweisen, die

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 20, 577 (1895).

**) Daselbst 20, 583 (1895).

zwischen α-Thiomilchsäure und dem nach seiner Auffassung analog konstituierten Cystein bestehen sollte. Er ist der Ansicht, dafs die Bildung der Thiomilchsäure aus dem Cystein durchaus analog der Entstehung der Hydroparakumarsäure aus dem Tyrosin sei, wie sie sich im Stoffwechsel resp. bei der Darmfäulnis regelmäfsig vollziehe, und veranschaulicht diese Beziehungen durch folgende Formeln:

$$\underset{\text{Tyrosin}}{C_6H_4\langle^{OH}-CH_2-CH\langle^{NH_2}.COOH} + HH = \underset{\text{Hydroparakumarsäure}}{C_6H_4\langle^{OH}-CH_2.CH_2.COOH} + NH_3,$$

$$\underset{\text{Cystein}}{CH_3-\overset{NH_2}{\underset{SH}{C}}-COOH} + HH = \underset{\alpha\text{-Thiomilchsäure}}{CH_3.CH(SH).COOH} + NH_3.$$

Mit dem von mir geführten Nachweis*), dafs das Cystein anders, als es Baumann annimmt, gebaut ist, fällt natürlich auch die Möglichkeit einer Abstammung der Thiomilchsäure aus dem Cystein, denn es ist klar, dafs ein Körper der Formel

$$\begin{array}{c} CH_2.SH \\ | \\ CH.NH_2 \\ | \\ COOH \\ \beta\text{-Cystein} \end{array}$$

den Übergang in

$$\begin{array}{c} CH_3 \\ | \\ CH.SH \\ | \\ COOH \\ \alpha\text{-Thiomilchsäure} \end{array}$$

nicht zuläfst.

Unter diesen Umständen sind für den von Suter mitgeteilten einmaligen Befund von α-Thiomilchsäure nur zwei Erklärungsmöglichkeiten vorhanden. Entweder ist die α-Thiomilchsäure entgegen den Angaben Suters ein primäres Spaltungsprodukt der Eiweifskörper, dann müfste sie aber konstant bei der Hydrolyse auftreten, oder sie ist in der That erst sekundär durch die kombinierte Lebensthätigkeit von Schimmel- und Fäulnispilzen entstanden, dann wäre ihre Muttersubstanz wahrscheinlich eine dem in meiner früheren Mitteilung postulierten α-Cystein nahestehende Verbindung, die aufzusuchen von Interesse sein müfste.

---

*) Diese Beiträge 3, 1.

Eine gelegentliche Beobachtung, die ich beim Verarbeiten von aus zersetzter Wolle stammenden Quecksilberniederschlägen machte, führte mich dazu, planmäßsig die Prüfung der ersteren der beiden erwähnten Möglichkeiten vorzunehmen. Diese Niederschläge waren in stark alkalischer Lösung durch Quecksilberacetat gewonnen und näher untersucht worden, weil ich auf Grund eines Versuches, der sich allerdings später nicht bestätigte, der Ansicht war, dafs sich bei der Hydrolyse der Wolle reichlich primär Cystein bildet. Nach Zersetzen der in viel Wasser suspendierten Niederschläge mit Schwefelwasserstoff wurde der Schwefelwasserstoff durch Hindurchleiten von Luft durch die siedende Flüssigkeit entfernt, und die schwefelwasserstofffreie Lösung unter stark vermindertem Druck konzentriert. Die aufgefangenen Destillate gaben nun mit Eisenchlorid eine sehr schwache, rasch verschwindende Blaufärbung und mit Kupfersulfat eine geringe, aber deutliche und bleibende violette Farbe. Damit war die Anwesenheit von α-Thiomilchsäure in der erhaltenen Zersetzungsflüssigkeit wahrscheinlich gemacht.

Ich nahm deshalb die von Suter begonnene Untersuchung an zersetzten Hornspänen wieder auf und benutzte gerade dieses Material, weil dasselbe bereits schon einmal unter bestimmten Bedingungen α-Thiomilchsäure geliefert hatte. Über die Einzelheiten des eingeschlagenen Verfahrens mag nachstehendes Protokoll Auskunft geben.

1 kg Hornspäne wird mit 3 Liter Salzsäure (spez. Gewicht 1,19) vier Stunden auf dem Sandbade gekocht. Nach dieser Zeit wird die erhaltene Zersetzungsflüssigkeit zum dicken Sirup eingeengt, auf 3 Liter mit Wasser aufgefüllt, mit konzentrierter Natronlauge (1 : 1) bis zur schwach sauren Reaktion versetzt und durch andauerndes Kochen mit Tierkohle entfärbt. Nach 24 Stunden wird die Flüssigkeit vom ausgeschiedenen Tyrosin und Cystin abfiltriert, das hellgelbe 2,8 Liter fassende Filtrat, das rasch nachdunkelt, mit Natronlauge genau neutralisiert und mit einer konzentrierten Lösung von 300 g Quecksilberacetat versetzt. Beim Zusetzen des Quecksilbersalzes färbt sich die Flüssigkeit auffallend rasch bräunlich, so dafs an eine oxydierende Wirkung des Quecksilbers zu denken ist. Die zu Anfang auf Zusatz von Quecksilberacetat entstehende geringe Trübung setzt nach kurzer Zeit einen schweren, weifsen Niederschlag ab, der nach 24stündigem Stehen abgesaugt wird. (Niederschlag 1.)

Der erhaltene Niederschlag wird sorgfältig ausgewaschen, durch Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, und die vom Quecksilbersulfid abfiltrierte Flüssigkeit stark eingedampft. Die konzentrierte Lösung wird wiederholt mit Äther ausgeschüttelt, giebt jedoch nur Spuren ätherlöslicher Substanz ab, die keine der für α-Thiomilchsäure

beschriebenen charakteristischen Farbenreaktionen mit Eisenchlorid oder Kupfersulfat zeigt, dagegen enthält die wässerige Lösung reichlich Cystein, das in schwach ammoniakalischer Lösung unter Zusatz von wenigen Tropfen Eisenchlorid durch Hindurchleiten von Luft zu Cystin oxydiert wird. Dasselbe scheidet sich nach Entfärben der Reaktionsflüssigkeit und Ansäuern mit Essigsäure in charakteristischer Krystallform ab.

Das Filtrat von Niederschlag 1 wird mit 30 ccm konzentrierter Natronlauge (1:1) alkalisch gemacht, der entstehende, zuerst weiſse, dann rasch grau werdende, verhältnismäſsig geringe Niederschlag (Niederschlag 2) abfiltriert und durch tagelang fortgesetztes Dekantieren mit Wasser gereinigt. Nach Zerlegung desselben durch Schwefelwasserstoff wird die Flüssigkeit in derselben Weise wie die entsprechende aus Niederschlag 1 erhaltene Flüssigkeit auf α-Thiomilchsäure untersucht, jedoch auch jetzt mit negativem Erfolge. Die Anwesenheit von Cystein konnte durch Farbenreaktionen festgestellt werden.

Zu dem Filtrat von Niederschlag 2 wird eine konzentrierte Lösung von 800 g Quecksilberacetat langsam und unter gutem Umrühren hinzugesetzt, die reichliche, rasch sich absetzende, grau gefärbte Fällung (Niederschlag 3) abgesaugt und mit Wasser so lange ausgewaschen, bis das ablaufende Waschwasser farblos ist, was mindestens ein achttägiges, fleiſsiges Auswaschen erfordert. Der Quecksilberniederschlag wird in viel Wasser suspendiert und durch Einleiten von Schwefelwasserstoff vom Quecksilber befreit, die entquecksilberte Flüssigkeit nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs zum dünnen Sirup eingedampft und mit Äther wiederholt ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung hinterläſst nach Abdestillieren des Äthers ein gelbgefärbtes Öl, das einen eigentümlichen, unangenehmen Geruch besitzt, wasserlöslich ist, starke Schwefelreaktion mit alkalischer Bleilösung giebt, mit Eisenchlorid sich vorübergehend intensiv blau färbt und mit wenig Kupfersulfat eine bleibende, prächtig tief blauviolette Farbenreaktion zeigt.

Nach diesem Verhalten war die Anwesenheit von α-Thiomilchsäure in dem ätherischen Auszuge vom Niederschlage 3 anzunehmen.

Zur Isolierung der α-Thiomilchsäure waren zwei Wege gegeben; einmal schien es möglich, sie in die in Wasser schwer lösliche Dithioverbindung überzuführen, andererseits war es wahrscheinlich, sie in Form der von Suter beschriebenen Benzylverbindung als Benzylthiomilchsäure fassen zu können. Da die Isolierung als Dithioverbindung, wie vorläufige Versuche zeigten, wenn überhaupt, nur sehr langsam zum Ziele geführt hätte, wurde der zweite Weg eingeschlagen.

Zu diesem Zweck wird das aus Niederschlag 3 erhaltene Öl, das die Reaktionen der α-Thiomilchsäure zeigt, mit Natronlauge und wenigen Tropfen Benzylchlorid mehrere Stunden geschüttelt. Ein Erwärmen zum Schluſs der Reaktion, wie es Suter angiebt, habe ich unterlassen, weil die dabei mögliche Umwandlung von aktivem Produkt in Racemkörper vermieden werden sollte. Nach Ausäthern des überschüssigen

Benzylchlorids wird die alkalische Reaktionsflüssigkeit mit Salzsäure übersättigt. Die entstehende milchige Trübung setzt sich nach längerem Stehen zum Teil ölig ab. Nachdem von diesem Öl abgegossen ist, setzt die noch immer milchig getrübte Flüssigkeit beim Aufbewahren im Eisschrank schön ausgebildete, farblose Prismen ab, die nach dem Trocknen sofort den von Suter für synthetisch erhaltene Benzyl-α-thiomilchsäure angegebenen Schmelzpunkt von 74° zeigen.

Die Hauptmenge des erhaltenen Benzylproduktes stellt das nicht krystallisierte Öl dar. Ich versuchte es durch längeres Stehen in der Kälte unter salzsäurehaltigem Wasser zum Krystallisieren zu bringen. Das Öl erstarrte zwar, wurde aber bei Zimmertemperatur wieder ölig. Die Krystallisation gelang aber leicht auf folgendem, einfachem Wege:

Das in der Kälte zum Erstarren gebrachte Öl wird mit Sodalösung übergossen, in der es sich unter Aufbrausen löst. Überläfst man diese nicht völlig klare Flüssigkeit einige Zeit bei Zimmertemperatur sich selbst, so scheidet sie nach längerem Stehen einen amorphen, flockigen Niederschlag aus, der sich nur sehr langsam absetzt. Nachdem die überstehende Flüssigkeit völlig klar geworden ist, wird sie wiederholt durch ein Barytfilter filtriert und von neuem mit Salzsäure in der Kälte übersättigt. Beim Aufbewahren im Eisschrank scheiden sich aus der milchig getrübten Flüssigkeit über Nacht reichlich Krystalle aus. Dieselben werden abgesaugt und mit Wasser ausgewaschen. Sie sind noch ziemlich bräunlich gefärbt. Zur weiteren Reinigung werden sie in Alkohol gelöst, die alkoholische Lösung mit Tierkohle entfärbt, das farblose Filtrat mit Wasser versetzt und die alkoholisch-wässerige Lösung in einer flachen Schale der freiwilligen Verdunstung überlassen. Es scheiden sich schön ausgebildete, farblose Prismen aus, die von neuem aus Sodalösung mit Hülfe von Salzsäure umkrystallisiert werden. Der Schmelzpunkt des so gewonnenen Körpers liegt bei 75°, derjenige von synthetisch erhaltener Benzylthiomilchsäure bei 74°. Auch die Löslichkeitsverhältnisse des Benzylproduktes entsprechen den über Benzylthiomilchsäure vorliegenden Angaben.

Die Analyse bestätigte, dafs das erhaltene Produkt Benzylthiomilchsäure sei.

0,1696 g im Vakuum getrockneter Substanz gaben nach v. Asboth 0,2001 g $BaSO_4$, entspr. 16,20 Proz. S.

Berechnet für $C_{10}H_{12}O_2S$	Gefunden
S 16,34 Proz.	S 16,20 Proz.

Die wässerige Flüssigkeit, die durch Zersetzen des Niederschlages 3 gewonnen war und die beim Ausäthern α-Thiomilchsäure geliefert hatte, gab starke Cysteinreaktionen, und es gelang, mittels Oxydation durch Lufteinleiten in die mit Eisenchlorid versetzte ammoniakalische Lösung Cystin daraus abzuscheiden. Auffallend war, dafs nach beendeter Oxydation sich durch häufiges Ausäthern von neuem eine stark schwefelhaltige Substanz gewinnen

liefs, die nach Abdestillieren des Äthers als nicht zur Krystallisation zu bringendes Öl zurückblieb. Es gelang, aus diesem Öl durch vorsichtige Oxydation mit verdünnter Salpetersäure einen bei 98° sinternden und bei 100° schmelzenden krystallisierten Körper darzustellen, jedoch reichte das erhaltene Material zu weiterer Verarbeitung nicht aus. Beobachtungen, die hier mitzuteilen zu weit führen würde, machen es wahrscheinlich, dafs dieser ätherlösliche Körper sekundär aus dem in der Lösung befindlichen Cystein durch Oxydation entstanden ist.

Der in obigem Versuch mitgeteilte Befund der α-Thiomilchsäure unter den Spaltungsprodukten der Hornsubstanz macht es wahrscheinlich, dafs die von Baumann ausgesprochene Vermutung, wonach die α-Thiomilchsäure in dem einen von Suter untersuchten Fall durch Lebensthätigkeit von Fäulnis und Schimmelpilzen entstanden sein sollte, irrig ist.

Der Grund, weshalb Suter nur einmal und nicht wieder α-Thiomilchsäure aufzufinden vermochte, wird durch einen Vergleich der von ihm und von mir benutzten Methoden verständlich. Suter legte anscheinend auf die Reaktion der von ihm untersuchten Flüssigkeit kein Gewicht, während aus meinen Versuchen hervorgeht, dafs zur erfolgreichen Ausfällung der α-Thiomilchsäure mit Quecksilbersalzen stark alkalische Reaktion neben einem grofsen Überschufs von Quecksilberacetat nötig ist. In dem einen von ihm mitgeteilten Falle, in dem er aus Tyrosinlaugen Thiomilchsäure isolieren konnte, besafs die zur Untersuchung kommende Flüssigkeit thatsächlich alkalische Reaktion, und hierin, nicht in der Lebensthätigkeit von Fäulnis- und Schimmelpilzen, ist vermutlich der Grund zu sehen, weshalb Suter sie gerade aus dieser Tyrosinlauge isolieren konnte.

Zur Entscheidung der Frage, ob die Thiomilchsäure ein konstantes Spaltungsprodukt der Keratinsubstanzen darstellt, oder, um mich vorsichtiger auszudrücken, nach der von mir benutzten Methode regelmäfsig unter diesen Spaltungsprodukten aufzufinden ist, habe ich einige andere Keratinsubstanzen in den Kreis der Untersuchung gezogen.

Die Methode, die ich dabei anwendete, war dieselbe wie die beim Horn benutzte, nur wurde von einer fraktionierten Darstellung der Quecksilberniederschläge abgesehen und die Quecksilberverbindung aus den neutralen vom Neutralisationsniederschlag befreiten Zersetzungsflüssigkeiten durch Fällen mit 400 g Quecksilberacetat auf 500 g untersuchtes Keratin bei stark alkalischer Reaktion dargestellt. Die Verarbeitung der Quecksilberniederschläge und die

Isolierung und Reindarstellung der Thiomilchsäure geschah in der bei den Hornspänen angegebenen Weise.

Diese Methode führte bei Verarbeitung von Gänsefedern leicht und rasch zum Ziel. Die erhaltene Benzylthiomilchsäure hatte die Eigenschaften und den Schmelzpunkt (73°) der gesuchten Benzyl-α-thiomilchsäure.

Bei der Untersuchung von Menschenhaaren erhielt ich jedoch beim Verarbeiten der Ätherauszüge der zersetzten Quecksilberniederschläge keine der für α-Thiomilchsäure charakteristischen Farbenreaktionen, obgleich reichliche Mengen bleischwärzender Substanz in den Ätherextrakten vorhanden waren. Es lag daher der Gedanke nahe, dafs ich in diesem Falle das Disulfid der α-Thiomilchsäure vor mir hatte, und so das Ausbleiben der Farbenreaktionen zu erklären wäre. In der That konnten, nach Reduktion des in Wasser aufgenommenen Schwefelkörpers mit Zink und Salzsäure und erneuter Extraktion mit Äther, sowohl die Farbenreaktionen der α-Thiomilchsäure erhalten, als auch reichliche Mengen von Benzyl-α-thiomilchsäure vom Schmelzpunkt 75° dargestellt werden.

Bei einem Versuche, die spezifische Drehung der aus Menschenhaaren dargestellten Benzyl-α-thiomilchsäure zu bestimmen, stellte es sich heraus, dafs die Substanz optisch inaktiv ist.

Die Elementaranalyse ergab folgende Zahlen:

0,1984 g Substanz gaben 0,4409 g CO_2, entspr. 60,61 Proz. C und 0,1094 g H_2O, entspr. 6,17 Proz. H.

Berechnet für $C_{10}H_{12}SO_2$	Gefunden
C 61,17 Proz.	C 60,61 Proz.
H 6,16 „	H 6,17 „

Auf Grund der bei den Haaren gemachten Beobachtung änderte ich bei Verarbeitung der vierten untersuchten Keratinsubstanz, der Wolle, die Methode dahin ab, dafs ich vor dem Ausäthern der aus den Quecksilberniederschlägen erhaltenen Zersetzungsflüssigkeiten dieselben erst mit Zink und Salzsäure reduzierte. Da sich beim Ausschütteln mit Äther in der Flüssigkeit immer wieder eine leichte Oxydationswirkung bemerkbar machte, wurde die von der ätherischen Lösung abgetrennte, wässerige Flüssigkeit in einem Gefäfs, auf dessen Boden sich einige Zinkstückchen befanden, aufgefangen und mit diesen vor erneutem Ausäthern erst einige Zeit in Berührung gehalten.

Als ich jetzt nach Abdestillieren des Äthers mit Kupfersulfat

auf α-Thiomilchsäure prüfte, wurde eine starke, bleibende, blauviolette Färbung erhalten. Auch die Eisenreaktion fiel positiv aus. Setzte ich aber in diesem Falle vor dem Zusatz von Eisenchlorid der Flüssigkeit einen Tropfen Ammoniak zu, so erhielt ich eine tiefrote, ins Violette ziehende Färbung, die beständig war und beim Schütteln nur intensiver wurde, eine Reaktion, die für Thioglykolsäure charakteristisch ist.

Es war also hier in dem Ätherauszuge neben Thiomilchsäure Thioglykolsäure vorhanden. Da eine Methode zur Trennung dieser beiden Substanzen nicht bekannt ist, habe ich vorläufig die Isolierung der Thioglykolsäure durch Überführung in ein charakteristisches Derivat nicht auszuführen vermocht, hoffe aber, diese Lücke bald ausfüllen zu können. Auch die Frage nach der Verbreitung der Thioglykolsäure ist aus demselben Grunde vorläufig unerledigt geblieben.

Zeigen die mitgeteilten Befunde einerseits, dafs die α-Thiomilchsäure konstant auf dem eingeschlagenen Wege unter den Spaltungsprodukten der Keratinsubstanzen aufzufinden ist, so lassen sie auf der anderen Seite einen Einwand gegen den eingeschlagenen Weg zu. Die Thatsache, dafs erst ein Überschufs von Alkali nötig ist, um die Quecksilberniederschläge zur Entstehung zu bringen, die die freien und reinen Schwefelverbindungen direkt geben, läfst die Deutung zu, dafs die betreffenden Verbindungen erst unter dem Einflufs des Alkali aus anderen, primär in den Zersetzungsflüssigkeiten vorhandenen Schwefelverbindungen abgespalten werden. Dafs aber nur geschwefelte Verbindungen als Muttersubstanzen der gefundenen Thiosäuren in Betracht kommen, geht mit Sicherheit aus quantitativen Versuchen hervor, die Suter*) über die Frage angestellt hat, ob Hornzersetzungsflüssigkeiten bei andauernder Behandlung mit Schwefelwasserstoff Schwefel zu binden vermögen. Ferner konnte Suter in einem direkten Versuche zeigen, dafs die so leicht nachzuweisende Brenztraubensäure bei der Hydrolyse des Horns unter den Spaltungsprodukten nicht auftritt, ein negativer Befund, der insofern von Wichtigkeit ist, als die Untersuchungen von Böttinger**) und Lovén***) gezeigt haben, dafs die Einwirkung von Schwefelwasserstoff auf Brenztraubensäure einen Körper liefert, der durch Reduktion leicht in α-Thiomilchsäure übergeführt werden kann.

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. **20**, 577 (1895).

) Liebigs Ann. **188, 310.

***) Journ. f. prakt. Chem. **29**, 366.

Wesentlich für die Verwertung der mitgeteilten Resultate zu Rückschlüssen über die Bindung des Schwefels in den Keratinsubstanzen ist aber augenscheinlich nur der Punkt, ob die erhaltene Thiomilchsäure beziehungsweise Thioglykolsäure als geschwefelte Körper in den Keratinzersetzungsflüssigkeiten vorhanden sind oder nicht, und daher ist — die Möglichkeit, dafs sie aus durch Alkali leicht zersetzlichen schwefelhaltigen Verbindungen stammen, zugegeben — dennoch der Schlufs berechtigt, dafs sie konstante Spaltungsendprodukte der Keratinsubstanzen darstellen. Damit ist aber auch für die schwefelhaltige Komponente der Keratinsubstanzen eine Gruppierung von Atomgruppen geboten, welche die leichte Bildung von Cystin, Thiomilchsäure (event. auch von Thioglykolsäure) ermöglicht, und es erhebt sich die weitere Frage, ob auch in den typischen Eiweifskörpern eine ähnliche Anordnung der schwefelhaltigen Gruppe vorliegt, eine Frage, die sowohl nach der chemischen wie nach der physiologischen Seite erhebliches Interesse beansprucht.

IX.

Über die Säureeigenschaften und das Molekulargewicht des Kaseins und seine Spaltung beim Trocknen.

Physikalisch-chemische Studie zur Eiweifschemie.

Von **E. Laqueur** und **O. Sackur.**

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen und der physikalisch-chemischen des chemischen Instituts der Universität Breslau.)

Das Kasein hat bekanntlich den Charakter einer schwachen Säure: es rötet feuchtes Lackmuspapier und bildet mit den Metallen salzähnliche Verbindungen*). Bei der grofsen Bedeutung, welche diese Salze in physiologischer Hinsicht haben, besonders die sauren wegen ihrer Beziehung zur Labgerinnung, sowie mit Rücksicht auf Widersprüche in der Auffassung derselben in der Litteratur schien es von Interesse, eine erneute Untersuchung des Kaseins mit physikalisch-chemischen Methoden in Angriff zu nehmen.

Unserer Untersuchung lag folgender Plan zu Grunde:

1. Das maximale Basenbindungsvermögen mufste neu bestimmt werden.

Dieses sollte uns erstens zur quantitativen Bestimmung sehr

*) Millon u. Comaille, Comptes rendus 11, 1867. — O. Hammarsten, Malys Jahresberichte für Tierchemie 2, 118 (1872); daselbst 4, 135 (1874); Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 227 (1883). — G. Courant, Pflügers Archiv 50, 109 (1891). — F. Söldner, Dissertation, Erlangen 1888. — M. A. Béchamp, Bulletin de la société chimique, série IV, tome IX. — Spiro u. Pemsel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 235 (1898). — L. Hirschstein, Dissertation, Breslau 1902. — Osborne, Journal of Physiology 1901/2, S. 399.

geringer Mengen von Kasein dienen, deren wir zur Feststellung seiner etwaigen Löslichkeit in reinem Wasser bedurften. Zweitens wollten wir durch das Basenbindungsvermögen das Äquivalentgewicht des Kaseins in seinen neutralen Salzlösungen ermitteln.

Durch Messung der Leitfähigkeit des elektrischen Stromes, mit deren Hülfe bereits Osborne die wahre Salznatur der Kaseinmetallverbindungen bewiesen hatte, beziehungsweise ihrer Veränderung mit der Verdünnung, sollte das Molekulargewicht ermittelt werden.

Die für Phenolphtalein sauer und für Lackmus neutral reagierenden Lösungen des Kaseins in Basen sind für diese Versuche nicht anwendbar, da sie neben den sauren Salzen wechselnde und zwar beträchtliche Mengen der Produkte der hydrolytischen Spaltung enthalten.

Als bequeme Methode zur ungefähren Messung der Gröfse der hydrolytischen Spaltung und so der relativen Stärke der Säure erwies sich die Messung der inneren Reibung.

2. Bei den für diese Untersuchungen notwendigen Trockenbestimmungen ergab sich eine Spaltung des Kaseins in einen löslichen und einen unlöslichen Körper, deren Eigenschaften näher untersucht wurden; hierzu wurden, soweit möglich, die beim Kasein angewandten physikalisch-chemischen Methoden benutzt, womit ihr Wert für die Charakterisierung chemisch ähnlicher Eiweifskörper erwiesen werden sollte.

Basenbindungsvermögen.

Das Kasein verhält sich Alkalien und Erdalkalien gegenüber wie eine Säure und bildet mit ihnen in Wasser leicht lösliche Salze, welche wie die der meisten Eiweifskörper richtige Salze im Sinne der van 't Hoff-Arrheniusschen Anschauungen sind*). Die prozentische Zusammensetzung derselben sowie das Verhalten ihrer wässerigen Lösungen gegen verschiedene Indikatoren ist unter anderen von Söldner, Courant, Spiro und Pemsel (l. c.) untersucht worden. Die genannten Autoren finden übereinstimmend, dafs die für Phenolphtalein neutralen Salze Lackmus und Lackmoid blau färben. Söldner verbrauchte zur Neutralisation einer Lösung, welche 1 g Kasein enthielt, bei Anwendung von Phenolphtalein im Mittel 8,3 ccm einer $^1/_{10}$-N.-Lauge (Kalkwasser oder Natronlauge),

*) Sjöquist, Scand. Arch. f. Physiologie 5, 277 (1894). — Bugarsky und Liebermann, Pflügers Arch. 72, 51 (1898).

bei Anwendung von Lackmus 5,6 ccm, Courant bei Anwendung von Phenolphtalein 9,5, bei Anwendung blauen Lackmoidpapiers 3,5 ccm, während Spiro und Pemsel fanden, daſs die Menge der zur Neutralisation verbrauchten Natronlauge bei Anwendung von Lackmoid gröſser wurde, je mehr Natronlauge im Überschuſs sie hinzufügten. Als Maximalwert erhielten sie 8,57 ccm $^1/_{10}$-N.-Natronlauge. Die schlechte Übereinstimmung der unter Anwendung von Phenolphtalein erhaltenen Zahlen beruht unter anderem darauf, daſs auch die sogenannten lufttrockenen Präparate, mit denen die genannten Autoren jedenfalls gearbeitet haben, wegen ihres wechselnden Feuchtigkeitsgehaltes nicht unmittelbar vergleichbar sind; die Titration mit Lackmus und Lackmoid kann in Lösungen verschiedener Konzentration, wie später ausführlich auseinandergesetzt werden soll, überhaupt keine übereinstimmenden Resultate ergeben, da die Kaseinsalze als Salze einer schwachen Säure mit starken Basen hydrolytisch gespalten sind.

Es erschien daher notwendig, das Basenbindungsvermögen des Kaseins neu zu bestimmen.

Die verwendeten Präparate wurden teils nach Hammarsten dargestellt, teils von Merck in Darmstadt und den Höchster Farbwerken bezogen.

Die Versuche wurden in der Weise vorgenommen, daſs eine abgewogene Menge lufttrockenen Kaseins teils mit einer überschüssigen Menge $^1/_{20}$-N.-Natronlauge, Barytwasser oder Kalkwasser versetzt und mit $^1/_{20}$-N.-Salzsäure oder Oxalsäure bis zur Entfärbung des Phenolphtaleins zurücktitriert (indirekte Titration), teils in weniger als der äquivalenten Menge Natronlauge gelöst und bis zum Eintritt der Rotfärbung titriert wurde (direkte Titration). Hierbei beoachteten wir, daſs sich Kasein in Erdalkalien viel langsamer löst als in Alkalien. Trotzdem die Lösungen etwas opalescent sind, läſst sich nach einiger Übung der Neutralisationspunkt, der auch bei Anwendung von Phenolphtalein wegen der Hydrolyse nicht absolut scharf ist, mit hinreichender Sicherheit feststellen. Derselbe wurde als erreicht betrachtet, wenn die Lösungen eine eben erkennbare blaſsrote Färbung angenommen hatten, bezw. (bei indirekter Titration) dieselbe gerade verschwunden war. Die gute Übereinstimmung der einzelnen Titrationen, besonders bei den letzten Präparaten, beweist, daſs die Fehlerquellen der Methode sehr gering sind. Die folgende Tabelle (S. 196) enthält die mit den einzelnen Präparaten erhaltenen Mittelwerte, und zwar in Spalte I die Nummer des Präparates, in Spalte II die Anzahl Kubikcentimeter $^1/_{10}$-N.-Lauge, die zur Neutralisation von 1 g lufttrockenen Kaseins verbraucht wurde, unter III die Gewichtsprozente, die das betreffende Präparat beim Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz verlor, und unter IV die für 1 g Trockensubstanz berechnete Acidität.

I	II	III	IV	
1	8,01	9,0 Proz.	8,90	Mittel 8,81
2	7,63	11,2 „	8,60	
2 a	7,75	10,3 „	8,65	
3	7,51	13,7 „	8,72	
4	7,65	15,5 „	9,05	
5	7,90	8,8 „	8,66	
Merck 1	7,82	9,8 „	8,85	
„ 2	7,98	11,7 „	8,86	
Höchst	8,10	8,25 „	8,83	

Präparat 2 a war durch Auflösen von 2 in verdünnter Natronlauge und Ausfällen mit Essigsäure dargestellt.

Die erhaltenen Zahlen, besonders die der letzten drei Präparate stimmen ausgezeichnet überein, wenn man die Acidität auf absolut trockene Substanz berechnet; daraus scheint hervorzugehen, dafs beim Trocknen bei etwa 100° keine chemische Veränderung vor sich geht, sondern der Gewichtsverlust von im Durchschnitt 10 Proz. auf Rechnung des von den hygroskopischen Pulvern mechanisch festgehaltenen Wassers, Alkohols und Äthers zu setzen ist. Dieser Schlufs hat sich jedoch im Verlauf der Untersuchung nicht bestätigt.

Löslichkeit.

Der Bestimmung der Löslichkeit des Kaseins in reinem Wasser stellen sich grofse Schwierigkeiten entgegen, da es nur sehr schwer möglich ist, Fäulniserreger auszuschliefsen. Den Versuch, dies durch Hinzusetzen eines Desinficiens zu erreichen — wir hatten Toluol gewählt —, mufsten wir aufgeben, da wir ja dessen Einflufs auf die Löslichkeit nicht kannten. Zur quantitativen Bestimmung des Kaseins schien uns sein Basenbindungsvermögen am meisten geeignet, da die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl bei sehr verdünnten Eiweifslösungen zu ungenau ist oder zu grofse Volumina beansprucht, da ferner ein Versuch, den Kaseingehalt einer Lösung durch Oxydation mit Kaliumpermanganat zu bestimmen, vergeblich gewesen war.

Eine abgewogene Menge, etwa 0,5 g Kasein, wurde in einer verschlossenen Flasche mit etwa 100 ccm reinen Wassers in einem Ostwaldschen Thermostaten bei 18° mittels eines Heifsluftmotors mehrere Tage geschüttelt; liefs sich der geringste Fäulnisgeruch wahrnehmen, so wurde der Inhalt weggegossen. Bei Schütteln bei 25° stellte sich fast regelmäfsig schon nach 2 Tagen Fäulnis ein. Der Inhalt der geruchlosen Flaschen, bei denen wir etwaige Fäulnis vernachlässigen zu

können glaubten, was uns die gute Übereinstimmung der Resultate bestätigte, wurde durch ein gewogenes Filter abfiltriert, der Rückstand bei 100° getrocknet und zurückgewogen, das Filtrat mit $^1/_{200}$-N.-Natronlauge bis zur Rotfärbung des Phenolphtaleins versetzt. Geht Kasein unzersetzt in Lösung, so mufs sich die gelöste Menge übereinstimmend durch den Gewichtsverlust der Substanz wie durch die zur Titration verbrauchten Menge Natronlauge bestimmen lassen.

Es zeigte sich, dafs das Filtrat immer schon durch wenige Tropfen der sehr verdünnten Lauge rot gefärbt wurde; der getrocknete Rückstand war in 9 von 12 angestellten Versuchen bis auf wenige Zehntel Milligramm mit teils positiven, teils negativen Differenzen gleich der angewendeten Menge; die geringe unregelmäfsige Gewichtsabnahme in den drei übrigen Versuchen ist wohl auf Versuchsfehler zurückzuführen, die bei der grofsen Adhäsionsfähigkeit der Eiweifskörper an die Glaswand der Flasche nur schwer zu vermeiden sind.

Es ergiebt sich also, dafs **reines Kuhkasein keine mefsbare Löslichkeit in reinem Wasser bei Zimmertemperatur besitzt**, ein Resultat, das auch in allerjüngster Zeit von Osborne (l. c.) im Gegensatz zu älteren offenbar nicht einwandfreien Versuchen von Béchamp*) gefunden wurde.

Äquivalent- und Molekulargewicht. Leitfähigkeit.

Die genaue Bestimmung des Basenbindungsvermögens des Kaseins ermöglicht auch eine genaue Bestimmung seines Äquivalentgewichtes. Wenn 1 g Kasein sich mit 0,881 Millimol. Natriumhydroxyd zu einem neutralen Salz verbindet — die Unabhängigkeit dieser Zahl von der Verdünnung beweist, dafs wir in diesen neutralen Lösungen thatsächlich eine nach konstanten Gewichtsverhältnissen zusammengesetzte chemische Verbindung vor uns haben — so beträgt das Äquivalentgewicht des Kaseins $\frac{1000}{0,881} = 1135$**), sein Molekulargewicht also ein ganzzahliges Vielfaches davon; das wievielfache, kann man allerdings aus den Titrationen nicht aussagen, da man nicht weifs, eine wievielbasische Säure das Kasein ist.

Eine Möglichkeit, diese Frage zu entscheiden, bietet sich nach dem Vorgange von Ostwald und Walden***) in der Messung des elektrischen Leitvermögens der neutralen Natriumsalze des Kaseins. Die genannten Autoren haben nämlich empirisch ge-

*) Béchamp, Bulletin de la société chimique, III. série, tome IX, 1894.

**) Höhere Angaben von Salkowski, Hammarsten, Lehmann und Hempel beruhen offenbar darauf, dafs die genannten Autoren nicht mit neutralen, sondern mit sauren Kaseinsalzen gearbeitet haben.

***) Zeitschr. f. physik. Chem. 1, 529 (1887); 2, 49 (1888); 8, 433 (1891).

funden, dafs für die Natriumsalze aller Säuren die Beziehung gilt $\Lambda_1 - \Lambda_2 = kn$, wenn Λ_1 und Λ_2 die Äquivalentleitfähigkeiten bei den Verdünnungen v_1 und v_2, n die Wertigkeit des betreffenden Anions und k eine von der Natur der Säure unabhängige Konstante ist. Für die Verdünnungen 32 und 1024 ist nach ihren Messungen k etwa $= 10$. Es liegt nahe, durch Messung des Aquivalentleitvermögens des Kaseinnatriums bei verschiedenen Verdünnungen mit Hülfe dieser Beziehung die Zahl n, d. h. die Wertigkeit des Anions, für Kasein zu bestimmen. Bei der Berechnung ist jedoch zu beachten, dafs für Kaseinnatrium k nicht gleich 10 sein kann.

Der Methode von Ostwald und Walden liegt nämlich die Anschauung zu Grunde, dafs der Dissoziationsgrad bei Salzen mehrbasischer Säuren mit wachsender Konzentration rascher abnimmt als bei einbasischen, und zwar um so rascher, je vielbasischer die Säure ist. Da nun der Dissoziationsgrad bei der Verdünnung v nach Arrhenius gleich $\frac{\Lambda v}{\Lambda \infty}$ ist, so ist die Abnahme desselben gleich $\frac{\Lambda_1 - \Lambda_2}{\Lambda \infty}$. Die absolute Abnahme des Leitvermögens $\Lambda_1 - \Lambda_2$ ist also nur dann ein Mafs für die Abnahme des Dissoziationsgrades und somit der Wertigkeit des betreffenden Anions verschiedener Säuren, wenn die Äquivalentleitfähigkeiten der verschiedenen Salze sich bei grofser Verdünnung demselben Grenzwert $\Lambda \infty$ nähern. Dies ist der Fall, wenn die Beweglichkeiten der verschiedenen Anionen wenigstens von derselben Gröfsenordnung sind, was bei den von Ostwald und Walden untersuchten Salzen zutrifft. Die Beweglichkeit des Anions des Kaseins ist aber infolge des hohen Molekulargewichts bedeutend kleiner, so dafs man nicht die absolute Abnahme der Leitfähigkeiten $\Lambda_1 - \Lambda_2$, sondern die relative $\frac{\Lambda_1 - \Lambda_2}{\Lambda_1}$ als Mafs für die Abnahme des Dissoziationsgrades und somit der Wertigkeit des Anions betrachten mufs, unter der Voraussetzung, dafs Λ_1 das Leitvermögen einer sehr verdünnten Lösung ist, das nicht weit von dem Grenzwert $\Lambda \infty$ entfernt ist.

Für diese relative Abnahme ergiebt sich aus den Zahlen von Ostwald und Walden*) für das Natriumsalz einer zweibasischen

*) Eine Zusammenstellung derselben vergl. bei Kohlrausch und Holborn, Leitvermögen der Elektrolyte, Leipzig 1898, S. 168 ff. Wir



Säure für die Verdünnungen 32 bis 512 (wegen der relativ hohen Eigenleitfähigkeit des uns zur Verfügung stehenden Wassers konnten verdünntere Kaseinlösungen nicht mit genügender Genauigkeit untersucht werden) im Mittel der Wert von etwa 0,15, für das einer dreibasischen Säure 0,22, einer vierbasischen 0,29, einer fünfbasischen 0,35 und einer sechsbasischen 0,39. Für k ergiebt sich hieraus ungefähr der Wert 0,07.

Die Leitfähigkeiten der neutralen Kaseinnatriumlösungen wurden nach der bekannten Kohlrauschschen Methode mit Wechselstrom und Telephon im Thermostaten bei 25° ausgeführt. Die konzentriertesten Lösungen wurden durch Auflösen der abgewogenen Kaseinmenge in den berechneten Volumen $^1/_{20}$-N-Natronlauge, die verdünnteren durch Verdünnen dieser Lösung mit dem gleichen Volumen Wasser im Leitfähigkeitsgefäſs *) selbst hergestellt.

Die einzelnen Versuchsreihen stimmten gut überein. Im folgenden sind nur die durch graphische Interpolation erhaltenen Mittelwerte angegeben. Die erste Spalte enthält den Prozentgehalt der Lösung an Kasein, die zweite die spezifische Leitfähigkeit $\varkappa$ in reziproken Ohm, die dritte die Verdünnung v in Äquivalenten des Natriums, die vierte das hierauf bezogene Äquivalentleitvermögen $\Lambda = \varkappa \, . \, 1000\, v$. Die spezifische Leitfähigkeit des benutzten Wassers betrug $2{,}6 \, . \, 10^{-6}$; dieselbe wurde von der spezifischen Leitfähigkeit der Lösungen abgezogen.

Proz. Kasein	$\varkappa$	v	Λ
2,84	$11{,}6 \, . \, 10^{-4}$	40	46,5
1,42	6,41 „	80	51,3
0,71	3,51 „	160	56,2
0,355	1,97 „	320	63,0
0,1775	1,09 „	640	69,5

Wie man aus der Kleinheit des Äquivalentleitvermögens ersieht, ist die Beweglichkeit des Kaseinanions viel geringer als die der bisher untersuchten organischen Säuren. Es ergiebt sich die relative Abnahme $\frac{\Lambda_{640} - \Lambda_{40}}{\Lambda_{640}} = 0{,}33$. Das Kasein ist also mindestens eine vierbasische Säure, möglicherweise jedoch eine fünf- oder sechsbasische. Eine genauere Entscheidung läſst sich wohl nicht treffen, da das Bild der Leitfähigkeiten durch die mit

bezeichnen mit Kohlrausch das Äquivalentleitvermögen mit Λ, während Ostwald und Walden dasselbe μ nennen.

*) Nach Arrhenius, Kohlrausch und Holborn, l. c., S. 15, Fig. 6.

wachsender Verdünnung zunehmende hydrolytische Spaltung verschoben wird.

Die Messung der Leitfähigkeiten von Kaseinammoniumlösungen, die durch Auflösen einer abgewogenen Menge Kasein in dem berechneten Volumen Ammoniak hergestellt wurden, ergaben ähnliche Resultate.

Proz. Kasein	$\varkappa$	v	Λ
2,04	$10{,}7 \cdot 10^{-4}$	55,6	59,6
1,02	5,90 "	111,2	65,6
0,51	3,21 "	222,4	71,4
0,26	1,73 "	445,0	77,2
0,13	0,96 "	890,0	85,3

Infolge der gröfseren Beweglichkeit des Ammoniumions gegenüber dem Natriumion sind die Äquivalentleitfähigkeiten des Kaseinammoniums gröfser als die des Natriumsalzes. Die relative Abnahme ist geringer, nämlich nur 0,30, weil das durch Hydrolyse in den verdünnteren Lösungen frei werdende Ammoniak den Strom schlechter leitet als das entsprechende Natriumhydroxyd.

Aus der Veränderung des Leitvermögens mit der Verdünnung geht hervor, dafs Kasein eine vier- bis sechsbasische Säure und sein Molekulargewicht demnach 4540, 5675 oder 6810 ist. Blum, Vaubel und Hedin berechneten dasselbe aus Spaltungsprodukten zu ungefähr 6600 *). Die letzten Angaben sprechen dafür, dafs Kasein eine sechsbasische Säure ist, doch ist eine endgültige Entscheidung über das Molekulargewicht des Kaseins noch nicht möglich.

Hydrolyse der Kaseinsalze.

Söldner sowohl wie Courant schliefsen aus den bei der Titration mit Lackmus, beziehungsweise Lackmoid erhaltenen Zahlen auf die Existenz von sauren Salzen des Kaseins, welche weniger Metall enthalten als die für Phenolphtalein neutralen. Die Existenz derselben ist an und für sich wahrscheinlich und durch die Thatsache bewiesen, dafs sich Kasein in weniger Natronlauge löst, als zur Neutralisation notwendig ist, sowie durch die von Courant beobachteten Verhältnisse bei der Labgerinnung. Doch ist es

*) Vgl. die Zusammenstellung bei Vaubel; Journ. f. prakt. Chemie 60, 55 (1899).



nicht möglich, aus dem übrigens sehr schlecht zu beobachtenden Farbenumschlag des Lackmus, bezw. Lackmoids die Äquivalentverhältnisse dieser sauren Salze zu berechnen, da sie stark hydrolytisch gespalten sind, worauf Courant schon hingewiesen hat.[1] Der für Lackmus neutrale Punkt ist nämlich nicht von der Konzentration unabhängig, wie es bei der Existenz wohl definierter Verbindungen notwendig wäre und wie es nach unseren Erfahrungen bei Anwendung von Phenolphtalein der Fall ist. Das beweist folgender einfache Versuch: Bringt man einen Tropfen einer für Phenolphtalein sauren, für Lackmus basischen Kaseinlösung auf Lackmuspapier, so wird dieses gebläut. Die Färbung geht aber bei Verdunsten des Wassers zurück und schlägt schliefslich in Rot um.

Die Erklärung dieses Versuches ist sehr einfach. Die Blaufärbung von Lackmus durch neutrales Kaseinnatrium wird ebenso wie die durch Natriumkarbonat verursacht durch die hydrolytische Spaltung des Salzes. Das Gleichgewicht, das in einer solchen Lösung besteht, ist bestimmt durch die Gleichung

$$\text{Kas.}\ n\,\text{Na} + n\,\text{H}_2\text{O} \rightleftarrows \text{Kas.}\ n\,\text{H} + n\,\text{NaOH},$$

wenn Kas. das Anion des Kaseins und n seine Wertigkeit bedeutet. Wenn Kasein eine schwache, wenig dissoziierte Säure ist, so müssen in der Lösung seiner Salze freie Hydroxylionen sein; daher ist dieselbe für solche Indikatoren, welche selbst relativ starke Säuren sind, wie z. B. Lackmus oder Lackmoid, basisch und nur für sehr schwach saure Indikatoren, wie Phenolphtalein, neutral.

Das durch die obige Gleichung beschriebene Gleichgewicht wird nach dem Gesetze der chemischen Massenwirkung zu Gunsten der rechten Seite verschoben durch gröfsere Verdünnung, d. h. durch Vermehren des Wassers und umgekehrt. Dies beweist der beschriebene Versuch; durch Verdunsten des Wassers wird die Hydrolyse zurückgedrängt und die Lösung weniger alkalisch und schliefslich sauer.

Nach der linken Seite verschoben wird das Gleichgewicht durch Vermehrung der Natronlauge; dies beweisen die Versuche von Spiro und Pemsel (l. c.).

Diese Autoren lösten Kasein in überschüssiger Natronlauge auf, fällten das gesamte Eiweifs der Lösung, d. h. sowohl das Kaseinnatrium wie die hydrolytisch abgespaltene freie Säure, mit Ammoniumsulfat aus und titrierten im Filtrat die freie Natronlauge, d. h. sowohl die überschüssige wie die hydrolytisch abgespaltene,

zurück. Je mehr Natronlauge sie hinzugesetzt hatten, um so weniger konnten sie im Verhältnis zurücktitrieren, d. h. um so weniger war hydrolytisch abgespalten worden. Bei genügendem Überschufs von Natronlauge gelingt es, die Hydrolyse praktisch vollkommen zurückzudrängen, und thatsächlich erhielten Spiro und Pemsel auf diesem Wege einen Maximalwert für das Basenbindungsvermögen des Kaseins (8,53), der mit dem unsrigen durch Titration mit Phenolphtalein erhaltenen (8,81) annähernd übereinstimmt.

Ähnliche Gesichtspunkte werden zur Erklärung dieser Versuche von Cohnheim und Krieger*) geltend gemacht.

Die Annahme einer hydrolytischen Spaltung infolge der schwach sauren Natur des Kaseins erklärt auch das Aussehen seiner Salzlösungen. Eine für Pheuolphtalein neutrale Kaseinnatriumlösung ist schwach opalescent; setzt man Alkali hinzu, so wird sie klarer, einige Tropfen verdünnter Säure machen sie opalescenter (Courant). Dieses Aussehen rührt von der hydrolytisch abgespaltenen undissoziierten freien Säure her, dem Kasein, das in reinem Wasser unlöslich ist und sich in Gegenwart von Kaseinsalz wohl im Zustande eines Hydrosols befindet.

Diese Fähigkeit einer Eiweifslösung, in reinem Wasser unlösliche Körper kolloidal zu lösen, scheint ganz allgemein zu sein**). Obwohl man in diesen Lösungen keine mikroskopisch wahrnehmbaren Teilchen unterscheiden kann, mufs man sie doch infolge ihrer Opalescenz als physikalisch inhomogen auffassen; denn diese kann nur dadurch entstehen, dafs inmitten der nicht homogenen Lösung Oberflächen vorhanden sind, an denen die Lichtstrahlen diffus reflektiert werden. Je stärker die Hydrolyse ist, um so mehr freie Säure wird abgespalten, und um so stärker mufs daher auch die Opalescenz werden, am stärksten bei den Salzen der schwächeren Basen, den Erdalkalisalzen.

Diffusibilität.

Aus den niedrigen Werten des Äquivalentleitvermögens der Kaseinsalze hatten wir auf eine geringe Wanderungsgeschwindigkeit des Kaseinanions geschlossen, die wohl durch den grofsen Querschnitt des Moleküls bedingt ist. Es erschien daher von Interesse, zu untersuchen, ob diese grofse Molekel wie andere ge-

*) Zeitschr. f. Biologie 22, 95 (1900).

**) Vgl. hierzu Paal, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 35, 2206 ff. (1902); ferner Sackur, Ztschr. f. physik. Chemie 41, 674 (1902).

löste Stoffe durch Pergamentpapier diffundieren kann, oder wie Kolloide durch dasselbe zurückgehalten würde. Der Versuch ergab das letztere; auch mit den schärfsten Eiweifsreaktionen konnte im Wasser des Dialysators kein Kasein nachgewiesen werden. Kaseinnatrium ist also ein Elektrolyt, welcher nicht die Fähigkeit besitzt, durch Pergament zu diffundieren. Da das Natriumion jedoch ein grofses Bestreben hierzu hat, so wird jedenfalls die Membran der Sitz einer beträchtlichen Potentialdifferenz sein, deren Gröfse uns nach der Nernstschen Theorie der Flüssigkeitsketten einen Aufschlufs über die Gröfse der Ionenbeweglichkeit des Kaseins geben könnte.

Innere Reibung.

Aus der Kleinheit der Ionenbeweglichkeit und der Gröfse des Moleküls der Kaseinsalze kann man einen Rückschlufs auf die innere Reibung ihrer Lösungen ziehen. Reyher*) hat gefunden, dafs z. B. in der Fettsäurereihe die innere Reibung der Lösungen sowohl der freien Säuren wie ihrer Natriumsalze mit wachsendem Molekulargewicht gröfser wird. Das Umgekehrte gilt nach Ostwald**) für die Ionenbeweglichkeit. Es war daher anzunehmen, dafs auch die innere Reibung von Kaseinnatriumlösungen aufserordentlich grofs ist. Der Versuch hat dies bestätigt.

Die innere Reibung wurde nach der von Arrhenius***) beschriebenen Poiseuille-Ostwaldschen Methode durch Messung der Ausflufsgeschwindigkeit aus einer Kapillare bei 15° gemessen. Bedeutet t die Zeit, in welcher reines Wasser aus der Kapillare ausströmt, s sein spezifisches Gewicht, T die Ausflufszeit desselben Volumens der Lösung, S ihr spezifisches Gewicht, so ist die innere Reibung der Lösung, bezogen auf Wasser als Einheit

$$\eta = \frac{S\,T}{s\,t}.$$

Die spezifischen Gewichte der konzentriertesten Lösungen wurden mit dem Pyknometer bestimmt — dieselben betrugen nie mehr als 1,006 —, die der verdünnteren durch Interpolation berechnet.

Es ergab sich für neutrale Kaseinnatriumlösungen:

(Tabelle s. folgende Seite.)

Nach Arrhenius (l. c.) gilt für Nichtelektrolyte und viele Elektrolyte die Beziehung

$$\eta = A^n \text{ oder } \log \eta = n \log A,$$

*) Zeitschr. f. physik. Chemie 2, 743 (1888).
**) Daselbst 2, 840 (1888).
***) Daselbst 1, 285 (1887).



n Normalität in Äquivalenten Na	Proz. Kasein	η (15°)	log A
0,0183	2,08	1,870	14,8
0,00915	1,04	1,353	14,3
0,00458	0,52	1,165	14,5
0,0137	1,55	1,581	14,5
0,00547	0,62	1,202	14,6

worin A eine nur von der Natur des gelösten Stoffes abhängige Konstante bedeutet. Wie die letzte Spalte zeigt, bestätigt sich dieses empirische Gesetz auch an diesen komplizierten Lösungen ausgezeichnet, obwohl die Konstante A von einer ganz anderen Gröfsenordnung ist (10^{14}) als bei den von Arrhenius u. a. untersuchten Lösungen, in denen A nicht viel gröfser als 1 ist.

Die Untersuchung der inneren Reibung bestätigt auch die oben entwickelten Anschauungen über die Konstitution der für Phenolphtalein neutralen und sauren Salze. Ihre Gröfse ist abhängig von dem Umfang, in welchem das Kasein als freies Ion, als elektrisch neutrales undissoziiertes Kaseinnatrium und als abgespaltene freie Säure vorhanden ist. Es ist anzunehmen, dafs sie vornehmlich durch die Konzentration des thatsächlich gelösten Kaseinsalzes beziehungsweise seiner Ionen bedingt ist.

Durch Zurückdrängung oder Vermehrung der Hydrolyse müfste dann bei konstantem Gesamteiweifsgehalt die innere Reibung zu- oder abnehmen.

Der Versuch bestätigte diese Schlufsfolgerung; durch Zusatz weniger Tropfen verdünnter Natronlauge wurde die Hydrolyse zurückgedrängt, durch Zusatz freier Salzsäure wurde sie vermehrt. Die innere Reibung dieser Lösungen betrug:

Proz. Kasein	Normalität des überschüssigen OH'	Normalität des überschüssigen H'	η
0,62	—	—	1,202
0,62	0,005	—	1,342
0,62	—	0,0022	1,128

Da die geringe Menge der zugesetzten freien Säure oder Base auf die innere Reibung der Lösung ohne merklichen Einflufs ist,

so mufs die beträchtliche Veränderung durch die Änderung der Kaseinionenkonzentration verursacht sein.

Um diese Folgerung zu bestätigen, stellten wir zwei weitere Versuchsreihen an.

Proz. Kasein	Normalität des überschüssigen OH	Normalität des überschüssigen Na	η	log A
0,716	—	0,006 3	1,24	14,8
0,716	0,006 3	0,012 6	1,36	—
0,716	0,012 6	0,018 9	1,38	—
0,716	0,018 9	0,025 2	1,34	—
0,58	—	0,005 13	1,20	15,4
0,58	0,009 8	0,014 9	1,33	—
0,58	0,016 8	0,021 9	1,26	—
	Normalität von zugesetztem Na Cl			
0,58	0,008 0	0,013 1	1,14	—

Hierbei fällt auf, dafs die innere Reibung nicht konstant durch Vermehrung der Hydroxylionen wächst, sondern bei einer bestimmten Konzentration derselben ein Maximum erreicht; durch Zusatz von Chlornatrium wird sie vermindert. Auch diese Ergebnisse lassen sich erklären durch die obige Annahme, dafs die innere Reibung vornehmlich durch die Konzentration der Kaseinionen bedingt ist.

Durch Zusatz von Natriumhydroxyd wird nämlich nicht nur die hydrolytische Spaltung des Kaseinsalzes in freie Base und ungelöste Säure, sondern auch die elektrolytische Dissoziation des Elektrolyten Kaseinnatrium in seine freien Ionen zurückgedrängt infolge der Vermehrung der Natriumionen. Beide Umstände haben nun offenbar einen entgegengesetzten Einflufs auf die innere Reibung.

Bei geringen Mengen freien Natriumhydroxydes überwiegt der erstere, der dieselbe vermehrt; ist die hydrolytische Spaltung fast vollkommen zurückgedrängt, so überwiegt der zweite, das heifst die innere Reibung mufs von einer gewissen Natriumhydroxydkonzentration an wieder abnehmen. Eine Vermehrung der Natriumionenkonzentration allein ohne Verminderung der Hydrolyse, wie sie durch den Zusatz von Natriumchlorid verursacht wird, mufs nur die elektrolytische Dissoziation und somit die innere Reibung verringern. Auch Reyher (l. c.) fand, dafs die

innere Reibung der stark dissoziierten fettsauren Salze beträchtlich größer ist als die der freien wenig dissoziierten Säuren.

Durch Ausdehnung dieser Untersuchungen auf andere Eiweißkörper wäre es wohl möglich, die innere Reibung von Eiweißlösungen zu einer experimentell sehr bequemen quantitativen Bestimmung ihrer hydrolytischen Spaltung und somit der relativen Stärke der freien Säuren beziehungsweise Basen zu benutzen.

Spaltung des Kaseins durch Trocknen.

Alle obigen Zahlen sind, wie üblich, auf Trockensubstanz berechnet, das heißt, ein Teil jedes zur Verwendung kommenden Präparates wurde zwischen 94 und 100° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, wozu 12 bis 18 Stunden immer ausreichten. Der Verlust an Gewicht wurde auf Verdunstung nicht chemisch gebundenen Wassers (beziehungsweise Alkohols und Äthers) bezogen. Die Präparate sehen nach dem Trocknen nicht sehr verändert aus, nur häufig etwas gelblich.

Behandelten wir nun dieses so getrocknete Kasein in ganz derselben Weise, wie oben vom lufttrockenen angegeben wurde, so konnten wir eine auffallende Verschiedenheit beobachten*). Beim Versuch, das getrocknete Kasein in $\frac{\text{Normal}}{20}$-Lauge aufzulösen, verwandelte sich das Präparat in eine mehr oder weniger gallertige Masse, die sich aus einer ziemlich klaren Flüssigkeit absetzte. Der gallertige Körper zeigte die Eigenschaften eines Eiweißkörpers, und auch aus der Flüssigkeit ließ sich ein dem Kasein ähnlicher Eiweißkörper durch verdünnte Säure ausfällen. Wir wollen der Kürze wegen den letzteren Körper, also den in verdünnten Laugen löslichen *A* nennen, den ersten, in Laugen unlöslichen ,gallertigen *B*.

Die Reinigung und Trennung des Körpers *A* von *B* gestaltet sich sehr einfach.

Der durch verdünnte $\frac{\text{Normal}}{10}$-Essigsäure gefällte flockige Niederschlag wurde auf Filtern gesammelt, mit Wasser ausgewaschen und durch Behandeln mit Alkohol und Äther in ein weißes, manchmal etwas graues, staubiges Pulver verwandelt. Schwieriger war, *B* ganz

*) Viele der von uns beobachteten Thatsachen fanden wir nachträglich in einer Arbeit von M. A. Béchamp (Bulletin de la société chimique, III. série, tome XI, 1894), die wir merkwürdigerweise nur einmal in der Litteratur (Beilstein, Handbuch d. organ. Chemie, 3. Aufl.) citiert fanden.



von A zu trennen, aufser wenn durch Trocknen bei höherer Temperatur, 102 bis 107°, der unlösliche Körper sich als ziemlich feste, nicht gallertige Masse in den verdünnten Laugen absetzte. In allen Fällen wurde dieser Rückstand B zuerst mit verdünnten Laugen $\left(\text{etwa } \frac{\text{Normal}}{200}\right)$, dann mit Wasser so lange, oft tagelang, dekantiert, bis eine Aufschwemmung in phenolphtaleinhaltigem Wasser von selbst rot wurde, was wir, wie erst weiter unten gezeigt werden soll, als Zeichen seiner Reinheit auffassen durften. B wurde dann durch Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe möglichst wasserfrei gemacht, was aber ganz erst durch Behandeln mit grofsen Mengen Alkohol gelang. Dieser wurde durch Äther ausgewaschen und nach dessen Verdunstung B gleichfalls als staubiges, etwas gelbliches Pulver gewonnen.

Über die Natur von A und B und ihr Verhältnis zum ursprünglichen Kasein können wir keine endgültigen Angaben machen; jedoch ist B sicher ein Alkalialbuminat, das heifst die Verbindung eines Alkalimetalls mit einem Eiweifsradikal, und A ein dem Kasein in chemischer Beziehung sehr nahe stehender Eiweifskörper, von ihm deutlich unterschieden in physikalisch-chemischer Hinsicht, wahrscheinlich aber noch keine einheitliche Substanz und somit kein Endprodukt der Zersetzung des Kaseins durch die Hitze. Es enthält vielmehr noch geringe Mengen des unzersetzten Kaseins und vielleicht solche anderen Körper, die als Zwischenprodukte der Spaltung aufzufassen sind und deren Menge von der zum Trocknen angewandten Temperatur abzuhängen scheint. Hierfür spricht, dafs A bei einigen Präparaten seinerseits nach dem Trocknen bei 100° mit verdünnten Alkalien ganz wie Kasein in einen löslichen und einen unlöslichen Teil zerfiel. Die Übereinstimmung der mit verschiedenen Präparaten erhaltenen Zahlen beweist jedoch, dafs A, wenn es unter denselben Bedingungen dargestellt ist, im wesentlichen als ein einheitlicher Körper aufzufassen ist, den wir daher mit dem Namen „Isokasein" bezeichnen wollen. Der unlösliche Körper B, der bei der Behandlung des getrockneten Kaseins mit verdünnter Natronlauge erhalten wurde, heifse Natriumkaseid*).

Um zu beweisen, dafs diese Zersetzung des Kaseins nicht etwa nur die Folge einer Oxydation durch den Sauerstoff der Luft, sondern dafs sie eine Folge des Erhitzens ist, wurde Höchster Kasein in einem Vakuum-Trockenschrank bei der Temperatur des siedenden Wassers unter gewöhnlichem Luftdruck, also bei etwa

*) Diese Namen verdanken wir einem Vorschlage von Herrn Prof. Röhmann.

98 bis 99° getrocknet. Das so getrocknete Kasein sah vollkommen weifs aus und hatte etwa 0,8 Proz. mehr an Gewicht verloren als das im gewöhnlichen Trockenschrank erhitzte, verhielt sich aber beim Lösen in verdünnter Lauge genau wie dieses, d. h. verwandelte sich zum Teil in Gallerte *B*, zum Teil in den löslichen Körper *A*. Aus diesem Versuche geht hervor, dafs zwar im gewöhnlichen Trockenschranke wohl eine Oxydation stattfinden kann, wofür die gelbe Farbe der Präparate und der Gewichtsunterschied gegenüber den im Vakuum getrockneten spricht, dafs sie aber mit der von uns beobachteten Spaltung nichts zu thun hat.

Ferner untersuchten wir, angeregt durch die Arbeit von Neumeister*) und die von E. Salkowski**) über die Einwirkung überhitzten Wasserdampfes auf Eiweifskörper — die genannten Autoren fanden eine Abspaltung von Ammoniak —, ob auch das getrocknete Kasein eine solche durch Behandeln mit Laugen erfahre.

2 g getrocknetes Kasein wurde im Schlösingschen Apparat mit 10 ccm filtrierten Kalkwassers übergossen, nach 48 Stunden die im darüber stehenden Schälchen befindliche $\frac{\text{Normal}}{10}$-Schwefelsäure mit $\frac{\text{Normal}}{20}$-Natronlauge zurücktitriert; die Abweichungen von der berechneten Menge lagen innerhalb der Fehlergrenzen.

Ammoniak wird also nicht abgespalten. Dies stimmt mit den späteren durch Analysen gefundenen Ergebnissen überein.

Um die Gewichtsverhältnisse festzustellen, nach denen sich das Kasein nach dem Trocknen in die Körper *A* und *B* spaltet, wurde wie folgt verfahren.

Eine abgewogene Menge Mercksches oder Höchster Kasein wurde zwischen 98 und 100° bis zur Gewichtskonstanz — in einem Falle vier Tage lang — getrocknet und in etwa 100 ccm Wasser mit $\frac{\text{Normal}}{20}$-Natronlauge bis zum Eintritt der Rotfärbung versetzt. Dazu war im allgemeinen etwas mehr Alkali erforderlich, als sich aus der Acidität des nicht getrockneten Kaseins berechnen liefs. (Ganz übereinstimmende Werte konnten jedoch nicht erhalten werden, da der Farbenumschlag infolge der gelbbraunen Färbung des unlöslichen Anteils undeutlich war und häufig nach einigem Stehen verschwand.) Der ungelöste voluminöse Anteil setzte sich über Nacht meist ganz gut ab. Die überstehende Flüssigkeit wurde durch einen Goochtiegel abgegossen, der Rückstand mehrmals dekantiert und schliefslich in den Tiegel gespült,

*) Neumeister, Zeitschr. f. Biol. 26 (1890); ebenda, 36, 1898.
**) E. Salkowski, ebenda 34 (1896) und 37 (1899).

Trotz starken Saugens mit der Wasserstrahlpumpe filtrierte das Waschwasser sehr langsam. Dann wurde der Tiegel bei 100° getrocknet und gewogen. Die Ergebnisse sind folgende:

1. Die Trockensubstanz wurde mit $\frac{\text{Normal}}{20}$ -Natronlauge behandelt:

0,825 g	Trockensubstanz	ergaben	denaturiertes	Eiweifs	*B*	0,686 g	83,2	Proz.
0,603 „	„	„	„	„	„	0,489 „	81,1	„
1,005 „	„	„	„	„	„	0,835 „	83,1	„
1,055 „	„	„	„	„	„	0,870 „	82,5	„
						im Mittel	82,5	Proz.

2. Nach Behandeln mit Calciumhydroxyd:

1,076 g	Trockensubstanz	ergaben	denaturiertes	Eiweifs	*B*	0,903 g	83,8	Proz.
1,180 „	„	„	„	„	„	0,999 „	84,6	„
3,959 „	„	„	„	„	„	3,199 „	80,6	„
						im Mittel	83,0	Proz.

In Anbetracht der relativ grofsen Versuchsfehler — dieselben sind oben bei Beschreibung der Löslichkeitsversuche angegeben worden — ist die Übereinstimmung der einzelnen Bestimmungen befriedigend.

Über das Isokasein (Körper *A*).

Fällungsgrenzen.

Um die Frage zu entscheiden, ob der in Alkalien lösliche Teil des getrockneten Kaseins, den wir oben mit *A* bezeichnet hatten, noch unverändertes Kasein ist oder einen neuen Eiweifskörper darstellt, bestimmten wir zunächst seine Fällungsgrenzen mit Ammoniumsulfat. Wir fanden für Kasein, richtiger für das Kaseinnatriumsalz als obere Fällungsgrenze in der üblichen Hofmeisterschen Bezeichnungsweise **3,4** bis **3,6** ccm *), in Übereinstimmung mit älteren Angaben, wobei wir es für unseren Fall für zweckmäfsiger hielten, die Fällung erst dann als beendet zu betrachten, wenn das Filtrat nicht nur mit hinzugefügten 0,2 ccm Ammonsulfat klar blieb, sondern auch keine Xanthoproteinreaktion mehr gab. Für Körper *A* fanden wir nach demselben Verfahren als obere Fällungsgrenze **4,0** ccm. Mit Magnesiumsulfat gelang es weder Kasein noch den Körper *A* aus seinen Lösungen vollständig auszusalzen, da selbst das nach Versetzen mit gesättigter Lösung erhaltene klare Filtrat mit konzentrierter Salpetersäure eine deutliche Eiweifsreaktion ergab. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Storch **), der ebenfalls mit Magnesium-

*) Fr. Alexander, Zeitschr. f. physiol. Chemie 25, 415 (1898).
**) Monatshefte der Chemie 1897, S. 294.

sulfat das Kasein nicht vollständig aus der Milch aussalzen konnte. Zinksulfat war zur Bestimmung der Fällungsgrenzen nicht anwendbar, da, wie der Versuch zeigte, beide Körper mit Zn-Ionen unlösliche Salze bilden.

Durch die Verschiedenheit der Fällungsgrenzen mit Ammoniumsulfat ist es als bewiesen zu betrachten, dafs in dem löslichen Körper *A* mindestens ein von Kasein verschiedener, schwerer auszusalzender Eiweifskörper enthalten ist.

Hierbei wollen wir auf die Analogie hinweisen, die zwischen der aussalzenden Wirkung der Salze und der in neuerer Zeit von Rothmund*), Abegg und Riesenfeld**) u. a. untersuchten Löslichkeitsbeeinflussung z. B. von Phenylthioharnstoff und Ammoniak durch Elektrolyte besteht. In beiden Fällen erweisen sich die Sulfate als am meisten, die Nitrate als am wenigsten wirksam. Das Aussalzen besteht demnach in einer Entziehung des Lösungsmittels durch den hinzugesetzten Elektrolyten beziehungsweise seine Ionen, welche wahrscheinlich hydratisiert sind***). Beim Zusatz von Salz zu einer Eiweifslösung wird sich das Wasser zunächst nach einem von der Natur der jeweiligen Stoffe abhängigen Verhältnis zwischen diesen verteilen. Ist die dem Eiweifs zur Verfügung stehende Menge nicht mehr grofs genug, es vollständig in Lösung zu erhalten, so beginnt die Fällung; sie ist beendet, wenn dieselbe nicht mehr ausreicht, mefsbare Mengen des Eiweifses zu lösen. Demnach werden die oberen Fällungsgrenzen nur von der Natur des Eiweifses und des Salzes, die unteren dagegen auch von der Konzentration der Lösung an ersterem abhängen. Da z. B. durch Ammonsulfat die meisten Eiweifskörper schon vor der Sättigung ausgesalzen werden, so müssen wir ihnen ein aufserordentlich grofses Hydratisierungsbestreben zuschreiben.

Basenbindungsvermögen.

Zur weiteren Untersuchung der Unterschiede des Körpers *A*, den wir fortan Isokasein nennen wollen, von Kasein wurde das Basenbindungsvermögen desselben bestimmt.

Hierzu verfuhren wir in derselben Weise wie beim Kasein, d. h. titrierten eine abgewogene Menge sowohl direkt als indirekt mit $\frac{\text{Normal}}{20}$-Natronlauge oder Kalkwasser unter Anwendung von Phenolphtalein als Indikator. Da wahrscheinlich *A* kein vollkommen einheitlicher Körper ist, erhielten wir bei den einzelnen

*) Rothmund, Zeitschr. f. physik. Chemie 33, 401 (1900).

**) Abegg und Riesenfeld, ebenda 40, 84 (1902).

***) Biltz, ebenda 40, 185 (1902).

Versuchen keine so gute Übereinstimmung, zumal wir nur mit sehr geringen Substanzmengen arbeiten konnten (0,1 bis 0,2 g).

Die folgende Tabelle giebt die Resultate. Reihe I enthält die Nummer des Präparates, als Mittel aus mehreren Titrationen, II die Anzahl Kubikcentimeter $\frac{\text{Normal}}{10}$ -Lauge, die zur Neutralisation von 1 g lufttrockner Substanz verbraucht wurden, III den Gewichtsverlust in Prozenten beim Trocknen zwischen 98 und 100°, IV die auf Trockensubstanz berechnete Acidität, V die Anzahl Kubikcentimeter $\frac{\text{Normal}}{10}$ -Lauge, die zur Neutralisation von 1 g getrockneter Substanz verbraucht wurde.

I	II	III	IV	V
1.	8,1	11,25 Proz.	9,1	10,6
2.	8,52	9,73 „	9,5	10,1
3.	9,0	12,44 „	10,3	10,5
			Mittel:	10,4

Wie spätere Versuche gezeigt haben, giebt das Isokasein viel schwerer das mechanisch festgehaltene Wasser (Alkohol, Äther) ab als das Kasein, so daſs an demselben Präparate zu verschiedenen Zeiten unternommene Trockenbestimmungen verschiedene Werte ergaben; es scheinen daher die in Reihe II und IV erhaltenen Zahlen wegen des wechselnden Wassergehaltes nicht ganz einwandfrei zu sein, sondern die unter Reihe V gewonnenen das richtige Basenbindungsvermögen von A auszudrücken.

Die für Phenolphtalein neutralen Lösungen des Isokaseins unterscheiden sich äuſserlich beträchtlich von den neutralen Kaseinlösungen. Sie sind nämlich nicht wie diese opalescent, sondern klar, jedoch gelb gefärbt. Man muſs daher annehmen, daſs die Salze von A nicht oder nur sehr wenig hydrolytisch gespalten sind und nicht, wie die Kaseinlösungen, zum Teil die freie Säure als Hydrosol enthalten. In Übereinstimmung hiermit ergab sich, daſs die für Phenolphtalein neutralen Lösungen des Natriumsalzes auch für Lackmus neutral sind und dasselbe nicht blau färben. Die Lösungen der Baryum- und Calciumsalze sind ganz schwach opalescent und ergeben mit Lackmus Blaufärbung, die jeooch bei Zusatz der ersten Tropfen $\frac{\text{Normal}}{20}$ -Säure verschwindet. Das Isokasein ist also eine stärkere Säure als Kasein, da es mit Natronlauge hydrolytisch gar nicht oder nur wenig gespaltene Salze bildet. Seine Salze mit schwächeren Basen dagegen (mit Baryum- oder

Calciumhydroxyd) sind merklich hydrolysiert, jedoch ebenfalls weniger als die entsprechenden Kaseinlösungen, wie sich aus der stärkeren Opalescenz und milchigen Farbe der letzteren ergiebt.

Das Äquivalentgewicht des Isokaseins berechnet sich aus seinem Basenbindungsvermögen zu 962, da 1 g Trockensubstanz zur Neutralisation 10,4 ccm $\frac{\text{Normal}}{10}$-Lauge verbraucht; dasselbe ist etwas niedriger als das des Kaseins (1135). Sein Molekulargewicht ist also ein ganzes Vielfache hiervon, das wir ebenfalls aus dem Leitvermögen der reinen Natriumsalzlösungen zu bestimmen versuchten.

Die Leitfähigkeitsmessungen wurden nach ganz derselben Methode wie bei den Kaseinsalzen bei 25° ausgeführt. In der ersten Reihe ist der Prozentgehalt der Lösung an Isokasein, in der zweiten die spezifische Leitfähigkeit $\varkappa$ in reciproken Ohm, in der dritten die Verdünnung v in Äquivalenten Natrium, in der letzten das Äquivalentleitvermögen Λ enthalten.

Prozent Isokasein	$\varkappa$	v	Λ
0,70	$4{,}93 \cdot 10^{-4}$	137	67,5
0,35	2,69	274	74,0
0,175	1,47	548	80,6
0,088	0,82	1096	89,2

Eine zweite Reihe ergab annähernd dieselben Resultate:

Prozent Isokasein	$\varkappa$	v	Λ
1,27	$7{,}91 \cdot 10^{-4}$	76	60,2
0,935	4,35	152	66,2
0,318	2,41	304	73,4
0,18	1.33	608	80,9
0,107	0,95	912	86,6

Die Äquivalentleitfähigkeiten des Natriumsalzes des Isokaseins sind merklich höher als die der Kaseinsalze in den entsprechenden Konzentrationen. Da die relative Zunahme derselben mit der Verdünnung annähernd ebenso grofs ist wie bei den Kaseinsalzen und sie sich nicht demselben Grenzwerte Λ_∞ nähern, so wird die höhere Leitfähigkeit nicht durch einen gröfseren Dissoziationsgrad, son-

dern möglicherweise durch die gröfsere Beweglichkeit des Anions bedingt sein. Da unser Körper A jedoch wohl kein chemisch einheitlicher Körper ist, so kann er neben den Beimengungen an ursprünglichem Kasein auch noch solche eines anderen, bei der Spaltung durch Hitze entstandenen, niedriger molekularen Körpers enthalten, dessen Anwesenheit das relativ hohe Leitvermögen erklären könnte.

Da die Zunahme der Äquivalentleitfähigkeit Λ mit der Verdünnung ganz ebenso grofs ist wie bei den Kaseinsalzlösungen, nämlich etwa 10 Proz. bei Verdoppelung des Volumens, so scheint das Isokasein eine ebenso vielbasische Säure zu sein wie das Kasein und demnach ein annähernd ebenso hohes Molekulargewicht zu besitzen, also das Vier- bis Sechsfache von 982.

Ein Diffusionsversuch durch Pergament bestätigte dieses hohe Molekulargewicht. Da nach mehreren Tagen im Dialysator kein Eiweifs nachzuweisen war, so fehlt auch den neutralen Lösungen von Salzen des Isokaseins die Fähigkeit, durch Pergament zu diffundieren.

Eine weitere Prüfung der ungefähren Gröfse des Molekulargewichts bietet nach unseren obigen Ausführungen die Messung der inneren Reibung seiner neutralen Lösungen, die ebenfalls auf dieselbe Weise wie bei Kasein bei 15° ausgeführt wurde. Die erste Reihe giebt wieder den Prozentgehalt der Lösung an Eiweifs, die zweite den Äquivalentgehalt von Natrium n, die dritte die innere Reibung $\eta = \frac{ST}{st}$, die vierte die nach der Arrheniusschen Formel $\eta = A^n$ berechnete Konstante $\log A$.

Prozent Isokasein	n	η	$\log A$
1,14	0,01186	1,695	19,3
0,57	0,00593	1,372	23,0
0,46	0,00474	1,312	24,7

Die Arrheniussche Formel bestätigt sich für Lösungen von Isokasein also nicht, da die Gröfse $\log A$ nicht konstant bleibt, sondern mit wachsender Verdünnung zunimmt.

Vergleicht man die Werte der letzten Reihe mit den entsprechenden für Kasein, so sieht man, dafs sie höher sind und zwar besonders in den verdünnteren Lösungen, dafs also die Salze

des Isokaseins eine noch höhere innere Reibung besitzen als die des Kaseins. Demnach müfste man dem Isokasein ein noch höheres Molekulargewicht zuschreiben als dem Kasein, wenn nicht, wie oben ausgeführt, die Konzentration des wirklich gelösten Eiweifses, in unserem Falle also hauptsächlich der Eiweifsionen, nicht aber die gesamte Eiweifskonzentration für die Gröfse der inneren Reibung mafsgebend wäre. Da nun Isokasein eine stärkere Säure ist als Kasein, und die Lösungen seiner Salze weniger hydrolysiert sind, so enthalten sie mehr Eiweifsionen als die entsprechenden Kaseinlösungen; dieser Unterschied wird nach dem Massenwirkungsgesetze um so gröfser sein, je verdünnter die Lösungen sind, und thatsächlich sind auch in unserem Falle die Unterschiede der inneren Reibung in den verdünntesten Lösungen am gröfsten.

Um diese Schlüsse einer weiteren Prüfung zu unterziehen, wurde wiederum die Änderung der inneren Reibung durch Zusatz von freiem Alkali und freier Säure gemessen. Es ergab sich:

Prozent Isokasein	Normalität des überschüssigen OH′	Normalität des überschüssigen H′	η
0,46	—	—	1,312
0,46	0,005	—	1,410
0,46	—	0,002	1,120

Wiederum nimmt durch Zusatz von freien OH′-Ionen die innere Reibung zu, aber bedeutend weniger als in den entsprechenden Kaseinlösungen (vgl. S. 204), da infolge der viel geringeren Hydrolyse sich durch ihre Zurückdrängung die Konzentration der Ionen des Isokaseinsalzes nicht um so viel vermehren kann wie die der Ionen des Kaseins. Umgekehrt ist die Veränderung der inneren Reibung durch Zusatz von freien H-Ionen eine gröfsere, da im Verhältnis zur hinzugesetzten Salzsäure auch Isokasein eine relativ schwache, d. h. wenig dissoziierte Säure ist, daher durch diese aus seinen Salzen verdrängt wird und in den undissoziierten Zustand übergeht.

Auch bei diesem Eiweifskörper giebt uns also die innere Reibung ein aufserordentlich einfach auszuführendes Verfahren zur Erforschung der Konstitution seiner Salzlösungen.

Wir haben also aus mehreren voneinander unabhängigen

physikalisch-chemischen Methoden gefolgert, dafs dem Isokasein annähernd dieselbe Molekulargröfse zukommt wie dem Kasein. Da es aber durch Abspaltung aus diesem entsteht — und zwar geht nach dem Trocknen zwischen 98 und 100° nur ungefähr ein Sechstel des Gewichtes des Kaseins mit Alkalien in Lösung —, so mufs das Molekül des Isokaseins durch Aneinanderlagerung von Atomkomplexen entstehen, die von mehreren Kaseinmolekülen abgespalten sind.

Ob diese Aneinanderlagerung, die wahrscheinlich durch Anhydridbildung bedingt ist, schon beim Behandeln der Trockensubstanz mit verdünnten Laugen oder erst beim Ausfällen des gelösten Körpers mit Essigsäure vor sich geht, läfst sich nach unseren bisherigen Versuchen nicht aussagen. Aufschlufs hierüber kann eine Untersuchung des Filtrates, das man beim Auflösen des getrockneten Kaseins erhält, ergeben.

Zu diesem Zwecke wurde eine abgewogene Menge getrockneten Kaseins mit etwas weniger Natronlauge versetzt, als zu seiner Neutralisation notwendig war, die klare Lösung von der unlöslichen Gallerte abfiltriert, nach Zusatz von Phenolphtalein möglichst genau bis zur Neutralisation titriert und auf ein bestimmtes Volumen verdünnt.

Dann wurden aliquote Teile dieser Lösung zur Messung der Leitfähigkeit und der inneren Reibung verwandt. In einem dritten Teile der Lösung wurde der Gesamtstickstoff nach Kjeldahl bestimmt und aus diesem die Eiweifskonzentration der Lösung berechnet. Die Natriumkonzentration war nicht bekannt, da ein Teil des zugesetzten Natriums noch im unlöslichen Körper *B* teils chemisch, teils mechanisch festgehalten wurde.

Die Ergebnisse zweier Versuchsreihen waren folgende:

Die erste Reihe enthält den Prozentgehalt der aus der ersten durch Verdünnung hergestellten Lösungen an Eiweifs, die zweite die spezifischen Leitfähigkeiten $\varkappa$, die dritte die innere Reibung η bei 15° C.

I. 1 ccm der Lösung enthielt 0,6984 mg N und somit 4,360 mg Isokasein. (Wie die unten angegebenen Analysen zeigen, enthält Isokasein 15,59 Proz. N auf Trockensubstanz berechnet.)

Prozent Eiweifs	$\varkappa$	η
0,436	$13{,}0 . 10^{-4}$	1,098
0,218	7,05	1,052
0,109	3,75	—
0,055	1,93	—

II. 1 ccm der Lösung enthielt 0,880 mg N und somit:

Prozent Eiweifs	$\varkappa$	η
0,542	$13,9 \cdot 10^{-4}$	1,131
0,271	7,72	1,074
0,136	4,07	—
0,068	2,11	—
0,034	1,20	—

Die Resultate beider Versuchsreihen, die recht gut übereinstimmen, sind in vieler Beziehung sehr auffällig, zunächst was die Leitfähigkeit anbetrifft.

Während (vgl. S. 212) eine neutrale Auflösung von Isokasein in Natronlauge, die 0,70 Proz. Eiweifs enthält, eine spezifische Leitfähigkeit von $\varkappa = 4,93 \cdot 10^{-4}$ besitzt, leitet eine Lösung von noch nicht ausgefälltem Isokasein, die nur 0,436 Proz. Eiweifs enthält, den elektrischen Strom fast dreimal so gut. Es müssen daher in der ersten Auflösung des getrockneten Kaseins, bezw. in dem ersten Filtrat des unlöslichen Körpers *B* aufser dem durch Essigsäure fällbaren Isokasein noch andere Elektrolyte gelöst sein, die ebenfalls durch Spaltung des Kaseinmoleküls entstanden sind. Als einen derselben gelang es uns phosphorsaures Natrium nachzuweisen. Fällt man nämlich aus diesem ersten Filtrat das Eiweifs mit Essigsäure, so erhält man durch Hinzufügen der gebräuchlichen Magnesiamischung eine feine Fällung, die sich nach Auflösen in Salzsäure durch Ammoniummolybdat in salpetersaurer Lösung als gelber Niederschlag absetzt; dadurch ist das Vorhandensein von HPO_4-Ionen in dem Filtrat bewiesen. Zu dem gleichen Schlusse zwingen uns die weiter unten angegebenen Analysenzahlen der beiden Spaltungsprodukte. Ob aufser der Phosphorsäure noch andere anorganische oder organische Stoffe aus dem Kaseinmolekül nach dem Trocknen durch verdünnte Natronlauge abgespalten werden, konnten wir nicht entscheiden.

Ferner ist es auffällig, dafs die spezifischen Leitfähigkeiten der Lösungen angenähert proportional mit der Verdünnung abnehmen, dafs also die ihnen entsprechenden Äquivalentleitfähigkeiten, deren absolute Gröfse man aus Unkenntnis der Natriumkonzentrationen nicht berechnen kann, nur wenig mit der Verdünnung wachsen und sich deutlich ihrem Grenzwerte nähern. Da aber das Leitvermögen dieser Lösungen zum Teil durch das Vorhandensein des phosphorsauren Salzes bedingt ist, wäre es unstatthaft, aus ihm

einen Schlufs auf die Wertigkeit des Eiweifsanions und somit auf seine Molekulargröfse ziehen zu wollen.

Dagegen gestattet dies die auffällig geringe innere Reibung der Lösungen. Während eine 0,46 proz. Lösung des mit Essigsäure gefällten Isokaseins eine innere Reibung von 1,312 besitzt, beträgt sie in dem an Eiweifs konzentrierteren ersten Filtrat der Auflösung des getrockneten Kaseins nur 1,131. In dieser Lösung scheint also das Eiweifs eine andere Molekulargröfse zu besitzen als nach dem Ausfällen und Wiederauflösen, da ja die Anwesenheit des sehr verdünnten phosphorsauren Salzes die innere Reibung kaum beeinflufst. Dies konnte sich möglicherweise auch in den Fällungsgrenzen mit Ammonsulfat zeigen, was auch thatsächlich der Fall war.

Während die obere Fällungsgrenze für die Lösung des ausgefällten und gereinigten Isokaseins nach der Hofmeisterschen Bezeichnungsweise bei 4,0 ccm (vgl. S. 17) liegt, liegt sie für die des noch nicht gefällten erst bei 4,3 ccm.

Hieraus folgt, dafs der noch nicht gefällte Eiweifskörper sich schwerer aussalzen läfst als das durch Essigsäure gefällte Isokasein, eine Thatsache, die in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der inneren Reibung steht und für ein kleineres Molekulargewicht sprechen kann.

Die Aneinanderlagerung der verschiedenen aus dem Kasein nach dem Trocknen durch Behandlung mit verdünnten Alkalien abgespaltenen Atomkomplexe zu dem Molekül, das wir mit Isokasein bezeichnen, scheint also wenigstens zum Teil erst beim Ausfällen mit Essigsäure stattzufinden.

Löslichkeit.

Die Löslichkeit des Isokaseins wurde in gleicher Weise wie beim Kasein (vgl. S. 196) zu bestimmen versucht. Wir konnten auch hier mit unseren Methoden keine Löslichkeit in reinem Wasser nachweisen.

Eiweifsreaktionen.

Isokasein giebt dieselben Reaktionen wie Kasein. Es bildet mit Schwermetallen unlösliche Salze (vgl. S. 209, Fällung durch Zinksulfat). Es wird durch Mineralsäuren und Essigsäure aus seinen Lösungen ausgefällt, desgleichen mit Phosphorwolframsäure in salzsaurer Lösung. Es giebt die Farbenreaktionen nach Millon,

Adamkiewicz*), Liebermann**) die Biuret- und Xanthoproteinprobe; die Schwefelbleireaktion giebt es gar nicht, während das Kasein diese doch angedeutet erkennen läfst, die Probe nach Molisch***) ebenfalls schwach, doch vielleicht etwas deutlicher als Kasein. Die Übereinstimmung der eben erwähnten Reaktionen mit denen von Kasein weist also darauf hin, dafs wesentliche Gruppen in beiden Körpern nicht verschieden sein können.

Gerinnung.

Bei der Gerinnung zeigen sich dagegen wieder wesentliche Differenzen.

0,3 g Kasein verschiedener Darstellung wurden in 10 ccm filtrierten Kalkwassers gelöst; nach Zusatz von 2,35 ccm Phosphorsäure (20 off.: 1000) gerann die Lösung durch wenig Lab (Kälbermagen) momentan, das Filtrat war vollkommen klar. Wurde Isokasein in derselben Weise behandelt, so gerann es zunächst überhaupt nicht; erst nach mehreren Stunden war ein Niederschlag zu sehen, während das Filtrat stark trübe war, auch wenn man gröfsere Mengen Lab zur Gerinnung anwendete.

Diese Erscheinung spricht dafür, dafs dem Isokasein noch geringe Spuren von Kasein beigemengt sind, die die verspätete Gerinnung verursachen. Auch die deutliche Zunahme der Opalescenz, welche wir, wie nachträglich bemerkt sein möge, beim Aussalzen des Isokaseins durch Ammoniumsulfat zwischen 2,4 und 2,6 ccm wahrnahmen, läfst sich durch diese Annahme erklären.

Wasser- und Aschegehalt.

Ebenso wie Kasein verliert das mit Alkohol und Äther getrocknete Isokasein beim Trocknen bei 100° bis zur Gewichtskonstanz zwischen 8 und 12 Proz. seines Gewichtes. Der Aschegehalt war von gleicher Gröfse wie beim Kasein, 1,4 Proz. im Durchschnitt.

Zur Kontrolle dieser Bestimmung und zur Prüfung der Reinheit unserer Kaseinpräparate untersuchten wir von jedem derselben den Aschegehalt. Hierbei ergaben sich die niedrigen Zahlen 0,25 bis 0,7 Proz., die wir für reines Kasein in der Litteratur angegeben

*) A. Adamkiewicz, Pflügers Archiv für die gesamte Physiologie 9 (1874).

**) L. Liebermann, Zentralblatt für die medizinischen Wissenschaften 1887.

***) H. Molisch, Monatshefte für Chemie 7 (1888).

fanden, nur, wenn wir die Substanz von der langsamen Verkohlung bis zum starken Glühen während der ganzen Dauer der Bestimmung in demselben Tiegel glühten. Bei dieser Methode gehen aber Aschebestandteile, die von Alkalien gebildet werden, verloren. Wir zogen darum ein genaueres Verfahren vor:

Wir verkohlten die Substanz langsam, nahmen die Kohle auf dem Wasserbade mit kochendem Wasser auf und filtrierten durch ein aschefreies Filter; nach dem Trocknen des Filters glühten wir den Tiegel bis zum völligen Verschwinden der Kohle unter Hinzufügen von kleinen Mengen Ammoniumnitrat und dampften dann erst das Filtrat, die löslichen Alkalisalze enthaltend, in dem Tiegel ein. Dabei ergaben sich für das Kasein, sowohl für selbst dargestelltes (nach der Hammarstenschen Methode mit nochmaligem Lösen in Ammoniak und Ausfällen durch Essigsäure) wie für das Merck sche und Höchster Kasein, Werte von 1,3 bis 1,4 Proz.

Obwohl nicht das Gesamtgewicht der Asche als Verunreinigung aufzufassen, sondern sicherlich ein nicht unbeträchtlicher Teil derselben auf Rechnung der beim Glühen aus dem Eiweifsmolekül entstehenden Schwefel- und Phosphorsäure zu setzen ist, so haben wir uns doch bei Berechnung der Analysen dem üblichen Verfahren, sie auf aschefreie Substanz zu berechnen, angeschlossen, sofern wir nicht wie bei Körper B ein wirkliches Salz vor uns hatten.

Das Isokasein ist kein Alkalisalz. Denn das durch Behandeln des getrockneten Kaseins mit Calcium- oder Baryumhydroxyd ausgefällte, mit Essigsäure dargestellte Präparat gab nach Auflösen in konzentrierter Salpetersäure keine Calcium- oder Baryumreaktion.

Analysen.

Der Stickstoff wurde nach der Kjeldahlschen Methode bestimmt.

Als Mittel von je zwei oder drei Bestimmungen ergab sich für Isokasein:

1. dargestellt durch Lösen des getrockneten Kaseins in Ammoniak . . . . 15,55 Proz.
2. dargestellt durch Lösen des getrockneten Kaseins in Natronlauge . . . . 15,63 „
3. dargestellt wie 2 . . . . 15,60 „

Also enthielt Isokasein 15,59 Proz. N, auf aschefreie Substanz berechnet . . . . . . 15,80 „ N

Für selbst dargestelltes Kasein hatten wir gefunden:
als Mittel aus 4 Bestimmungen . . . . . . 15,27 „
auf aschefreie Substanz berechnet . . . . . 15,45 „ N

Für Höchster Kasein gleichfalls
als Mittel von 4 Bestimmungen . . . . . . 15,27 „
auf aschefreie Substanz berechnet . . . . . 15,48 „ N

Die Schwefelbestimmungen wurden nach der Methode von Asboth*) ausgeführt.

Es ergab sich für Isokasein im Mittel	0,764	Proz.
auf aschefreie Substanz berechnet	0,774	„
nach derselben Methode für Kasein im Mittel	0,747	„
auf aschefreie Substanz berechnet	0,757	„

Der Phosphor wurde nach der Methode von A. Neumann**) bestimmt.

Es ergab sich für Isokasein im Mittel	0,724	Proz.
auf aschefreie Substanz berechnet	0,734	„
für Kasein	0,761	„
auf aschefreie Substanz berechnet	0,772	„

Über das Natriumkaseid (Körper *B*).

Wie schon oben kurz erwähnt, gewannen wir *B*, indem wir getrocknetes Kasein mit einer mehr als seiner Acidität entsprechenden Menge Lauge behandelten. Der entsprechende unlösliche Körper war mehr oder weniger gallertig, desto mehr sich einem festen Zustande nähernd, bei je höherer Temperatur (bis 107°) und je längere Zeit (bis 96 Stunden) das Kasein getrocknet worden war. Der Rückstand wurde dann oft dekantiert und endlich durch Behandeln mit grofsen Mengen Alkohol und Äther als feines, staubiges, meist gelbliches Pulver gewonnen.

Körper *B* ist ein Alkalialbuminat, d. h. eine unlösliche Verbindung eines Eiweifsradikals „Kaseid“ mit einem Alkalimetall.

Hierfür sprach zunächst, dafs zur Ausfällung des Isokaseins aus der bei Behandeln des getrockneten Kaseins mit Laugen erhaltenen Lösung nur etwa $^1/_3$ bis $^1/_2$ der Säure erforderlich war, welche sich aus der Acidität des getrockneten Kaseins berechnen liefs; es war also ein Teil des Metalls der Lauge von dem gallertigen Niederschlage gebunden worden. Ferner war sehr bemerkenswert, dafs sich dieser schnell und in ziemlich fester Konsistenz absetzte, wenn statt der meist angewandten Natronlauge oder Ammoniak Calcium- oder Baryumhydroxyd zum Auflösen des getrockneten Kaseins verwandt wurde; dies findet leicht in dem höheren spezifischen Gewichte der Metalle der beiden letzten Basen eine Erklärung.

Löst man das auf diese Weise dargestellte Kaseid in kon-

*) Vergl. A. Düring, Über Schwefelbestimmung u. s. w., Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 281 (1896).

**) Arch. f. Anatom. u. Physiol. Physiol. Abteilung 1900, S. 159.

zentrierter Salpetersäure und verdünnt mit Wasser, so fällt ein nunmehr in Alkalien leicht löslicher Körper aus, dessen Lösung mit Ammoniumoxalat, beziehungsweise -sulfat deutliche Calcium- beziehungsweise Baryumreaktion zeigt. Dieser Versuch beweist die salzartige Natur des Körpers *B*. In einem durch Behandeln des getrockneten Kaseins mit Natronlauge dargestellten Präparat wurde das Natrium quantitativ bestimmt.

Die Substanz wurde vorsichtig verkohlt, mit Schwefelsäure ausgelaugt, das Filtrat eingedampft und das Natrium als Sulfat gewogen. Es ergab sich ein Gehalt von 1,8 Proz. Na.

Löslichkeit und Hydrolyse.

Die Löslichkeit des Natriumkaseids in reinem Wasser ist ebenso wenig wie die des Kaseins oder des Isokaseins der Messung zugänglich.

Jedoch mufs sie vorhanden sein, da *B* durch Wasser hydrolytisch gespalten wird.

Wir hatten, wie bereits oben erwähnt (S. 207), bei Darstellung von *B* die Präparate so lange dekantiert, bis ihre Aufschwemmung phenolphtaleinhaltiges Wasser rot färbte, da wir dies als ein Zeichen der Reinheit der Präparate, d. h. ihrer Freiheit von mechanisch festgehaltenem Kasein oder Isokasein ansahen; denn solange noch einer dieser sauren Körper vorhanden ist, nimmt er natürlich frei werdendes Alkali für sich in Beschlag und verhindert so eine Rötung des Phenolphtaleins. Um nun anderseits zu beweisen, dafs die Färbung der Aufschwemmung von B nicht etwa durch mechanisch festgehaltene Natronlauge, was nach dem Behandeln mit Wasser und Alkohol recht unwahrscheinlich war, sondern durch wirklich infolge der Hydrolyse freiwerdende Natronlauge zustande kommt, stellten wir folgenden Versuch an.

Das Natriumkaseid wurde mit Alkohol etwa eine Stunde gekocht, der Alkohol abfiltriert, im Becherglase eingedampft und der geringe Rückstand in Wasser gelöst. Dieses blieb nach Zusatz von Phenolphtalein farblos.

Hinzuzufügen ist noch, dafs die Hydrolyse durch die kleinsten Mengen starker Säuren sofort zurückgedrängt wird, dafs also die Rötung des Wassers beim ersten Tropfen verschwindet.

Eiweifsreaktionen.

Das Natriumkaseid giebt dieselben Farbreaktionen wie Kasein und Isokasein, jedoch im Gegensatz zu ersteren die Schwefelbleireaktion sehr deutlich.

Wasser- und Aschegehalt.

Die Gewichtsabnahme beim Trocknen des Natriumkaseids betrug ebenso wie beim Kasein und Isokasein 7 bis 12 Proz. Die Asche wurde nach der oben beschriebenen Methode (S. 219) bestimmt. Bei einem durch Behandeln mit Kalkwasser dargestellten Präparat war nach dem Auslaugen der verkohlten Substanz das Filtrat stark alkalisch und zeigte Schwefelsäure-, Phosphorsäure- und Calciumreaktionen. Die Gesamtasche betrug bei mehreren durch Behandeln des getrockneten Kaseins mit Natronlauge oder Kalkwasser dasgestellten Präparaten 3,2 bis 4,1 Proz.

Analysen.

Die Analysen wurden nach den oben ausgeführten Methoden unternommen.

Der Stickstoffgehalt wurde entweder aus einer oder als Mittel aus zwei Analysen bestimmt.

B_1 14,77 Proz. N
B_2 15,04 „ N
B_3 15,30 „ N
} als Mittel aus je zwei Analysen

B_4 15,34 Proz. N
B_5 14,72 „ N
B_6 15,22 „ N
B_7 15,35 „ N
} je eine Analyse

Mittel aus allen Bestimmungen: 15,09 Proz. N.

Die Verschiedenheit des Stickstoffgehaltes der einzelnen Präparate ist nicht so bedeutend, daſs wir auch Bedenken gegenüber der Einheitlichkeit des Körpers *B* haben müſsten.

Der Schwefelgehalt betrug als Mittel aus zwei Bestimmungen: 0,753 Proz.

Der Phosphorgehalt ergab als Mittel aus 4 übereinstimmenden Bestimmungen aus zwei Präparaten 0,586 Proz. Ein mit einem dritten Präparat erhaltener Wert von 0,455 ist offenbar als fehlerhaft auszuschlieſsen.

Eine Zusammenstellung der Analysen ergiebt folgende Tabelle:

	N	P	S	Na
Isokasein	15,80	0,734	0,774	—
Natriumkaseid	15,09	0,586	0,753	1,8
Kasein	15,48	0,772	0,757	—

Die Unterschiede der drei Eiweiſskörper im Schwefelgehalt sind sehr gering, etwas gröſser im Stickstoffgehalt. Am auffälligsten ist der sehr geringe Gehalt des Natriumkaseids an Phosphor. Die Differenz mit Kasein erklärt sich durch die Abspaltung von Phosphorsäure, welche nach Behandeln des getrockneten Kaseins mit Alkalien in der Lösung nachgewiesen wurde (siehe

oben S. 216). Auch Béchamp (l. c.) hat nach einer kurzen Erwähnung den durch Trocknen bei 140° erhaltenen unlöslichen Körper an Phosphor und Stickstoff ärmer gefunden als Kasein.

Spaltung anderer Kaseine durch Trocknen.

Diese hier vom Kuhkasein ausführlich beschriebene Spaltung durch Trocknen zwischen 98 und 100° und Behandeln mit verdünnten Laugen zeigte auch von uns selbst dargestelltes Ziegenkasein und das von Herrn Professor Röhmann dargestellte und uns überlassene Frauenkasein. Wurden diese beiden Kaseine in verdünnten Laugen nach dem Trocknen zu lösen versucht, so verwandelte sich ebenfalls der Hauptteil in unlösliche Gallerte, während aus dem klaren Filtrat ein Eiweifskörper durch verdünnte Säuren ausgefällt werden konnte. Auf diese Spaltungsprodukte näher einzugehen war uns leider nicht möglich.

Wir haben nachgewiesen, dafs die Kaseine beim Trocknen bei 100° eine tief greifende Veränderung erleiden; man kann daher den hierbei eintretenden Gewichtsverlust nicht lediglich auf Rechnung des mechanisch gebundenen Wassers setzen, sondern mufs eine chemische Veränderung, etwa eine innere Anhydridbildung annehmen. Ähnliches ist möglicherweise auch bei anderen Eiweifskörpern der Fall, und der Satz Cohnheims: In trockenem Zustande vertragen die Eiweifskörper höhere Hitzegrade, bis zu 110 und 130°, darf nur mit Vorbehalt angenommen werden. Auch die übliche Berechnung aller an Eiweifspräparaten erhaltenen Analysenzahlen (bes. H) auf Trockensubstanz, wenn die Trocknung bei Temperaturen über 90° stattfindet, kann nicht ohne weiteres als berechtigt anerkannt werden; es mufs für jeden einzelnen Fall nachgewiesen werden, dafs der Eiweifskörper beim Trocknen keine Veränderung erlitten hat.

Zusammenfassung.

Kuhkasein hat in reinem Wasser keine mefsbare Löslichkeit.

Aus den für Phenolphtalein neutralen Alkali- und Erdalkalisalzen berechnet sich sein Äquivalentgewicht zu 1135; aus der Veränderung der Äquivalentleitfähigkeit dieser Alkalisalze mit der Verdünnung sein Molekulargewicht als das Vier- bis Sechsfache davon.

Die Salze des Kaseins sind hydrolytisch gespalten. Dies wird bewiesen durch die optischen Eigenschaften der Lösung,

durch die Abhängigkeit des für Lackmus, Lackmoid und ähnliche Indikatoren neutralen Punktes von der Konzentration und durch die grofse Abhängigkeit der inneren Reibung von geringen Mengen freier Säure und freien Alkalien. Die grofse innere Reibung der Kaseinsalzlösungen ist vornehmlich bedingt durch die Konzentration der Kaseinionen.

Das bei 100° getrocknete Kasein wird durch verdünnte Laugen in zwei Körper gespalten, von denen der eine in diesen unlöslich ist („Kaseid") und eine Verbindung eines Eiweifsradikals mit dem Metall der entsprechenden Lauge darstellt („Natriumkaseid"). Der andere in Alkalien lösliche (Isokasein) ist ein dem Kasein ähnlicher Körper mit annähernd gleichem Molekulargewicht, jedoch stärkerem Säurecharakter. Seine Verschiedenheit vom Kasein wird bewiesen durch die höheren Fällungsgrenzen, die anderen physikalisch-chemischen Eigenschaften *) seiner Lösungen (höhere Aquivalentleitfähigkeit, gröfsere innere Reibung, klare Löslichkeit) und den höheren Stickstoffgehalt.

Ziegen- und Frauenkasein erleiden ebenfalls durch Trocknen und Behandeln mit Laugen eine Spaltung, die der am Kuhkasein beobachteten anscheinend ähnlich ist.

Die weitere Untersuchung müfste ergeben, ob diese beiden von uns Isokasein und Natriumkaseid genannten Eiweifskörper vollkommen einheitlich sind, beziehungsweise unter welchen Umständen Kasein getrocknet werden mufs, um beim Behandeln mit Laugen in einheitliche Spaltungsprodukte zu zerfallen; ferner, wie sich diese zu den Spaltungsprodukten der anderen Kaseine verhalten.

*) An dieser Stelle wollen wir nicht verfehlen darauf hinzuweisen, dafs die physikalisch-chemischen Methoden (Leitfähigkeit, innere Reibung) viel bequemer auszuführen und weniger zeitraubend sind als die chemischen Analysen, und, wie das Beispiel des Isokaseins zeigt, bei nahezu gleicher chemischer Zusammensetzung zweier Körper doch ihre Verschiedenheit sicher festzustellen gestatten. Hierin liegt ihre Bedeutung zur Charakterisierung von Eiweifskörpern.

Breslau, Juli 1902.

X.

Untersuchungen über physikalische Zustandsänderungen der Kolloide.

Zweite Mitteilung.

Verhalten der Eiweifskörper gegen Elektrolyte.

Von Dozent Dr. **Wolfgang Pauli.**

(Ausgeführt mit Unterstützung der Kaiserlichen Akademie der Wissenschaften.)

(Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie in Wien. Vorstand: Professor R. Paltauf.)

Die durch Elektrolyte in Eiweifslösungen hervorgerufenen Zustandsänderungen sind verschieden, je nachdem es sich um die Einwirkung von Salzen, Säuren oder Basen handelt. In den folgenden Untersuchungen wurden zunächst die von den Salzen eingeleiteten Veränderungen nach ihrer physikalisch-chemischen Seite berücksichtigt, weil dieselben wegen der mangelnden Komplizierung mit sekundären chemischen Reaktionen für das Studium einfachere und übersichtlichere Verhältnisse bieten.

Unter den Zustandsänderungen der organischen Kolloide, die sämtlich ein mehr oder minder labiles und reaktionsfähiges Material bilden, werden mit gutem Rechte die vollständig reversiblen als Ausdruck einer wenig tief greifenden chemischen Alteration betrachtet. Von diesem Gesichtspunkte aus lassen sich die Salze hinsichtlich ihrer Wirkungen auf gelöstes Eiweifs ungezwungen in zwei grofse Gruppen scheiden, die Neutralsalze der Alkalimetalle (und des Magnesium) und die der Schwermetalle. Die von den ersteren erzeugten Fällungen sind im allgemeinen reversibel, sie werden durch Konzentrationsverminderung des fällenden Salzes (Dialyse oder Verdünnung) zurückgebildet, ein Merkmal, welches in dieser Weise den Schwermetallfällungen nicht zukommt.

Es sollen zunächst die Einwirkungen der Alkali- und Schwermetallsalze getrennt behandelt und erst zum Schlusse die Beziehungen derselben ausgeführt werden. Sämtliche Versuche wurden aus Gründen, die ich schon in früheren Abhandlungen ausgeführt habe, vorläufig an den nativen Eiweifskörpern des Eierklars vorgenommen.

Die Neutralsalze der Alkalimetalle, soweit dieselben Eiweifs

fällen, haben seit den grundlegenden Forschungen **Hofmeisters** über die Salzwirkung eine immer zunehmende Bedeutung für die Trennung und Charakterisierung der Proteinsubstanzen und ihrer nächsten Abkömmlinge erlangt und für das Studium fundamentaler biologischer Vorgänge wie Eiweifsabbau, Immunisation (E. P. **Pick**) unschätzbare Dienste geleistet. Demgegenüber ist die Einsicht in das Wesen der von denselben hervorgerufenen kolloidalen Zustandsänderungen nur langsam fortgeschritten. Jeder Versuch, über die Wirkung gelöster Salze Näheres zu erfahren, mufs vor allem darauf gerichtet sein, den Anteil der elektrisch neutralen Moleküle und der Ionen an derselben festzustellen und bei den letzteren den Effekt, welcher dem Anion und Kation zukommt, abzugrenzen.

Eine Theorie, welche die Beziehungen von Eiweifs und Salzen in einer Lösung umfassen soll, hat notwendigerweise nicht nur die Verhältnisse bei der festen Abscheidung von Eiweifs zu berücksichtigen, sondern auch alle jene zahlreichen Fälle aufzuklären, in welchen unter keinen Umständen eine Zustandsänderung des gleichzeitig in Lösung vorhandenen Eiweifs wahrnehmbar wird. Der Umstand, dafs bislang vorwiegend die eiweifsfällenden Salze ins Auge gefafst wurden, hat die Erkenntnis der im Grunde einfachen Gesetzmäfsigkeiten, welche die Wechselwirkungen von Eiweifs und Salzen beherrschen, verhindert. In der That konnten die Hauptsätze einer solchen Theorie aus grofsenteils schon bekannten Thatsachen fertig abgeleitet werden und die meisten der im folgenden mitgeteilten Versuche ergaben sich als unmittelbare Konsequenzen derselben. Für die Darstellung wurde jedoch im Interesse der Einheitlichkeit und Eindringlichkeit der Beweisführung der Weg vorgezogen, zunächst sämtliche wesentlichen Versuche anzuführen und, auf dieselben gestützt, die Gesetze der Salzwirkung abzuleiten.

Versuche.

In methodischer Hinsicht wäre vorauszuschicken, dafs ein wie bei den früheren Untersuchungen[1]) von allen faserigen Beimengungen gereinigtes, vollständig klares Hühnereiweifs zur Anwendung kam, von welchem stets 2 ccm dem bereit gestellten Salzgemisch zugesetzt wurden. Da es sich in den Versuchen um das Zusammenwirken von Elektrolyten in mehr oder minder grofsen Mengen handelte, war die Frage zu entscheiden, ob sämtliche Versuche bei konstantem Gesamtvolumen oder konstanter Menge Lösungsmittel anzustellen seien. Die Antwort konnte nur in dem Sinne lauten, dafs in jeder Versuchsreihe das Lösungsmittel in kon-

stanter*) Menge genommen werden müsse, da dessen wechselnde Verringerung unter Wahrung desselben Gesamtvolums sowohl für die Salzlöslichkeit als auch für die Eiweifsfällung gegenüber der eigentlichen Salzwirkung ausschlaggebend wird. Dadurch können die Resultate verdeckt und die Versuchsgrenzen eingeengt werden. Gegenüber diesen Nachteilen konnte die unvermeidbare geringe Änderung der Niederschlagsdichte durch dessen Verteilung auf einen gröfseren Raum nicht in Betracht kommen. Übrigens waren die durch verschiedene Salze hervorgerufenen Volumsänderungen in vielen Fällen von annähernd gleicher Gröfse, und die Ergebnisse solcher Versuche standen in trefflicher Übereinstimmung mit den Fällen, wo Abweichungen merklich wurden. Der Einflufs dieser Umstände liefs sich auch durch entsprechende Variation der Versuche eliminieren und findet bei der Zusammenfassung derselben noch nähere Berücksichtigung. In manchen Experimenten, bei welchen das eine Salz in derselben Menge eingetragen wurde, während das zweite in der Konzentration wechselte, konnte ein Mittelweg eingeschlagen werden. Es wurde nämlich das erste Salz zu einer hochgesättigten Normallösung gelöst und je ein gleicher Raumteil derselben allen Proben zugesetzt, während das variierende Salz abgewogen in die Versuchslösung eingebracht wurde. Auch hier traten die erwarteten Gesetzmäfsigkeiten mit grofser Deutlichkeit zu Tage.

Auf eine gerade für die Fällung durch die neutralen Alkalisalze erfahrungsgemäfs wenig belangvolle Änderung der natürlichen Reaktion der Eiweifslösung durch Zusätze von schwachen Säuren oder sauren Salzen wurde verzichtet. Dies konnte um so eher geschehen, als wir durch die Ausführungen Friedenthals[2]), welche auf der modernen Theorie der Farbstoffindikatoren basieren, wissen, dafs das Eierklar normalerweise gegen Phenolphtalein neutral reagiert und nur infolge der willkürlichen Verwendung des Lackmusindikators als alkalische Flüssigkeit gilt. Die angegebenen Konzentrationen der Salze entsprechen Äquivalent-Normallösungen.

Sämtliche Versuche, in welchen die möglichen Kombinationen von Salzen ein- und mehrwertiger Säuren und verschieden- wie gemeinioniger Elektrolyte berücksichtigt sind, wurden thunlichst so eingerichtet, dafs die resultierenden Trübungen in der Nähe der Fällungsgrenze liegen, um die Differenzen deutlicher erkennbar zu machen. Sie zerfallen in zwei Gruppen, I. Zusammenwirken von fällenden Elektrolyten, II. von fällenden mit nicht fällenden Elektrolyten.

---

*) Es bestand in der Regel aus 8 ccm Wasser und 2 ccm Eiweifslösung. Das Krystallwasser wurde stets berücksichtigt.

1. Kombinationen fällender Elektrolyte.

a) KCl bezw. NaCl + $NaC_2H_3O_2$.

Salze a	Zustandsänderung*)		Salze a	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24 h		sofort	nach 24 h
1. KCl 3,6	klar	sehr zarte Trübung	7. Natriumacetat 2,5	klar	sehr zarte Trübung
2. KCl 3,00	wasserklar	feinste Opalescenz	8. NaCl 3,5	klar	sehr zarte Trübung
3. 1,00 KCl + 1,50 Natriumacetat	wasserklar	sehr feine Trübung	9. 1,00 NaCl + 1,5 Natriumacetat	klar	sehr feine Trübung
4. 2,00 KCl + 1,5 Natriumacetat	wasserklar	zarte Trübung	10. 2,00 NaCl + 1,5 Natriumacetat	sehr zarte Trübung	fein-milchige Trübung
5. 3,00 KCl + 1,00 Natriumacetat	klar	zarte Trübung	11. 3,00 NaCl + 1,00 Natriumacetat	sehr zarte Trübung	zarte Trübung
6. 3,00 KCl + 1,50 Natriumacetat	zart-opalescente Trübung	milchige Trübung	12. 3,00 NaCl + 1,5 Natriumacetat	zarte Trübung stärker als 11	milchige Trübung

Von Kalium- und Natriumchlorid wurden die entsprechenden Volumina einer 4,5 Normallösung, von Natriumacetat die betreffenden Mengen in Substanz zugesetzt.

Die Versuche zeigen, dafs es durch Kombination der zwei fällenden Sazle einbasischer Säuren, Kaliumchlorid oder Kochsalz, mit Natriumacetat möglich ist, Fällungen zu erzielen, selbst wenn jedes einzelne der Salze unter seinem Fällungswerte gelegen ist. Es tritt also eine Summierung der Wirkungen ein, wobei der Beitrag jedes einzelnen Salzes zum Gesamteffekt mit dessen Konzentration und dem spezifischen Fällungswerte wächst. (Die Acetate erscheinen etwas wirksamer als die Chloride.) Verwendet man statt des verschiedenionigen Chlorkaliums das Natriumchlorid in Kombination mit Natriumacetat, so tritt nur eine kaum merkliche Verstärkung des fällenden Effektes zu Tage.

*) Es kam in den vorliegenden Versuchen nicht auf absolute Messung von Dichtigkeitsunterschieden, sondern auf die einem jeden Beobachter mögliche Wahrnehmung deutlicher Niederschlagsdifferenzen an. Die Skala der in den Tabellen gewählten Bezeichnungen wäre etwa: wasserklar, klar, Opalescenz, sehr zarte (feine) Trübung, zarte T., fein-milchige T., milchige T., dicke Fällung.

b) $MgSO_4$ + NaCl.

Salze b	Zustandsänderung		Salze b	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24h		sofort	nach 24h
1. $MgSO_4$ 2,5	klar	zarte Trübung (dichter als 4)	6. 2,00 $MgSO_4$ + 3,5 NaCl	Trübung wie 9	milchige Trübung
2. $MgSO_4$ 3,00	sehr zarte Trübung	milchige Trübung	7. 2,5 $MgSO_4$ + 1,00 NaCl	zarte Trübung	fein-milchige Trübung
3. NaCl 3,5	klar	zarte Opalescenz	8. 2,5 $MgSO_4$ + 1.5 NaCl	Trübung etwas dichter als 7	milchige Trübung wie 2
4. NaCl 4,00	zarte Opalescenz	sehr zarte Trübung	9. 2,5 $MgSO_4$ + 2,00 NaCl	Trübung dichter als 8	opake milchige Trübung
5. 1,00 $MgSO_4$ + 3,5 NaCl	sehr zarte Trübung	zarte Trübung			

Magnesiumsulfat wurde in entsprechenden Quantitäten einer 4,5 Normallösung, das Kochsalz in Substanz gewogen zugesetzt.

Auch in dieser Kombination eines fällenden Salzes einer zweibasischen mit einem ebensolchen einer einbasischen Säure zeigt sich die Summierung des Fällungseffektes der Komponenten, wobei das Überwiegen des stärker fällenden Magnesiumsulfats über Chlornatrium in allen Versuchen deutlich ist.

So ist nicht nur die Wirkung von 2,5 $MgSO_4$ + 2,00 NaCl, sondern auch die von 2,5 $MgSO_4$ im Vereine mit 1,5 und selbst 1,00 NaCl und endlich die von 3,00 $MgSO_4$ allein deutlich überlegen dem Fällungsvermögen von 1,00 $MgSO_4$ + 3,5 NaCl.

c) $(NH_4)_2SO + NaC_2H_3O_2$.

d) $(NH_4)_2SO_4 + K_2C_4H_4O_6$.

Salze c	Zustandsänderung		Salze d	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24 h		sofort	nach 24 h
1. $(NH_4)_2SO_4$ 2,5	sehr zarte Trübung	fein-milchige Trübung	1. Kaliumtartrat 2,00	zarte Trübung	fein-milchige Trübung
2. Natriumacetat 2,5	klar	sehr zarte Trübung	2. 1,5 Kalium-tartrat + 0,5 $(NH_4)_2SO_4$	feine Opa-lescenz	zarte Trübung
3. 2,00 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,00 Natrium-acetat	sehr zarte Trübung	fein-milchige Trübung	3. 1,00 Kalium-tartrat + 1,00 $(NH_4)_2SO_4$	sehr feine Opa-lescenz (fast klar)	sehr zarte Trübung
4. 2,00 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,5 Natrium-acetat	zarte Trübung	milchige Trübung	4. Kaliumtartrat 2.5	fein-milchige Trübung	milchige Trübung
			5. 1,5 Kalium-tartrat + 1,00 $(NH_4)_2SO_4$	zarte Trübung	fein-milchige Trübung
			6. 1,00 Kalium-tartrat + 1,5 $(NH_4)_2SO_4$	sehr zarte Trübung (etwas stärker als d_1)	fein-milchige Trübung (etwas stärker als d_1)

Ammonsulfat wurde einer 5fach-Normallösung entnommen, die anderen Salze in Substanz zugesetzt.

Versuch c illustriert wie die früheren die Summierung nach dem Fällungswerte der Komponenten.

Versuch d zerfällt in zwei Gruppen von den konstanten Gesamtkonzentrationen 2,00 (d_1 d_2 d_3) und 2,5 (d_4 d_5 d_6). Wie in c die Überlegenheit des Sulfates über das Acetat, so tritt bei dieser Anordnung in besonders eindringlicher Weise das Überwiegen des Fällungsvermögens des Tartrates über jenes des Sulfats hervor. Jede Kombination, in welcher das Sulfat auf Kosten des Tartrates wächst, wirkt schwächer fällend und umgekehrt.

e) $K_3C_6H_5O_7 + NaCl$.

f) $K_3C_6H_5O_7 + (NH_4)_2SO_4$.

Salze e	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24 h		sofort	nach 24 h
1. Kaliumcitrat 1,25	sehr schwache Opa-lescenz	Opa-lescenz	1. Kaliumcitrat 1,5	sehr zarte Trübung	zarte Trübung
2. NaCl 3,50	klar	zarte Opa-lescenz	2. $(NH_4)_2SO_4$ 2,5	sehr zarte Trübung	fein-milchige Trübung
3. NaCl 4,00	zarte Opa-lescenz	sehr zarte Trübung	3. 1,25 Kalium-citrat + 1,00 $(NH_4)_2SO_4$	fein-milchige Trübung	milchige Trübung
4. 1,25 Kalium-citrat + 1,00 NaCl	zarte Trübung	fein-milchige Trübung	4. 1,25 Kalium-citrat + 1,5 $(NH_4)_2SO_4$	milchige Trübung	dichte milchige Trübung
5. 1,25 Kalium-citrat + 2,00 NaCl	fein-milchige Trübung	milchige Trübung	5. 1,00 Kalium-citrat + 2,00 $(NH_4)_2SO_4$	milchige Trübung (etwas dichter als f_4)	dichte milchige Trübung (etwas dichter als f_4)
6. 1,00 Kalium-citrat + 3,00 NaCl	zarte Trübung (etwas dichter als e_4)	fein-milchige Trübung (etwas dichter als e_4)			

Kaliumcitrat und Natriumchlorid in abgewogenen Mengen, Ammonsulfat in entsprechenden Raumteilen einer 5fach-Normallösung zugesetzt.

Das Verhalten von Kombinationen fällender dreibasischer Salze mit ein- und zweibasischen ist den früheren Versuchen a bis d analog, indem auch hier die Summierung der Fällungswerte wiederkehrt.

2. Kombinationen fällender und nicht fällender Elektrolyte.

g) NaCl + NH_4Cl, NaBr, KBr, NH_4Br, NaJ, KJ, NH_4J, $MgCl_2$.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24h		sofort	nach 24h
1. 3,00 NaCl + 1,00 NH_4Cl	klar	sehr feine Opalescenz	7. 3,5 NaCl + 2,00 NH_4Br	fast klar	feine Opalescenz
2. 3,00 NaCl + 2,00 NH_4Cl	fast klar	deutliche Opalescenz	8. 3,5 NaCl + 1,5 NaJ	Opalescenz	Opalescenz
3. 3,00 NaCl + 3,00 NH_4Cl	sehr zarte Opalescenz	sehr zarte Trübung	9. 3,5 NaCl + 1,5 KJ	klar	klar
4. 3,5 NaCl	Opalescenz	sehr zarte Trübung	10. 3,5 NaCl + 1,5 NH_4J	wasserklar	wasserklar
5. 3,5 NaCl + 2,00 NaBr (Krystalle am Boden)	sehr zarte Trübung	feinmilchige Trübung	11. 3,5 NaCl + 1,5 $MgCl_2$	sehr zarte Trübung	feinmilchige Trübung
6. 3,5 NaCl + 2,00 KBr	sehr zarte Trübung	feinmilchige Trübung	12. 3,5 NaCl	zarte Opalescenz	sehr zarte Trübung

In den Versuchen 1 bis 3 inkl. wurde Kochsalz in entsprechenden Raumteilen einer 4,5-Normallösung, Chlorammonium dem Gewichte nach zugesetzt.

In den übrigen Versuchen sind alle Salze in Substanz verwendet und zwar in 4 bis 7 inkl. auf 8 ccm Wasser und 2 ccm Eiweifslösung, in 8 bis 12 inkl. wegen der besseren Löslichkeit auf 9 ccm Wasser + 2 ccm Eiweifslösung.

Die nicht fällenden Salze verhalten sich zugesetzt zu Chlornatrium, welches in Konzentrationen nahe am Fällungswerte vorhanden ist, nicht einheitlich.

Magnesiumchlorid und Ammoniumchlorid zeigen eine geringe, aber deutliche Steigerung des Fällungsvermögens von Chlornatrium, ebenso Bromnatrium und Bromkalium. Bromammonium, Jodnatrium, Jodkalium und besonders Jodammonium zeigen eine deutliche Hemmung der fällenden Wirkung des Chlornatriums.

b) $KCl + NaBr, KBr, NH_4Br, NaJ, KJ, NH_4J, MgCl_2$.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24 h		sofort	nach 24 h
1. 3,5 KCl	zarte Opalescenz	zarte Trübung	6. 3,5 KCl + 1,5 NaJ	feine Opalescenz	Opalescenz
2. 3,5 KCl + 2,00 NaBr (einige Krystalle ungelöst)	fein-milchige Trübung	fein-milchige Trübung	7. 3,5 KCl + 1,5 KJ	klar	klar
3. 3,5 KCl + 2,00 KBr	fein-milchige Trübung	fein-milchige Trübung	8. 3,5 KCl + 1,5 NH_4J	wasserklar	klar
4. 3,5 KCl + 2,00 NH_4Br	fast klar	Opalescenz	9. 3,5 KCl + 1,5 $MgCl_2$ (einige Kryst. ungelöst)	sehr zarte Trübung	fein-milchige Trübung
5. 3,5 KCl	Opalescenz	sehr zarte Trübung			

Sämtliche Salze in Substanz, in den Versuchen 1 bis 4 inkl. auf 8 ccm Wasser, in den Versuchen 5 bis 9 inkl. auf 9 ccm Wasser und je 2 ccm Eiweifslösung zugesetzt.

Die fällende Wirkung des Kaliumchlorids wird durch den Zusatz von Chlormagnesium, Natrium- und Kaliumbromid gesteigert, durch Ammoniumbromid, Natrium-, Kalium- und Ammoniumjodid gehemmt.

i) KCl bezw. $NaCl + KNO_3$, $Mg(NO_3)_2$, $NaCl + NH_4NO_3$, $KCNS$, NH_4CNS.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24 h		sofort	nach 24 h
1. 3,5 KCl	sehr zarte Trübung	zarte Trübung	7. 3,5 $NaCl + 2{,}00\ KNO_3$	fein-milchige Trübung	milchige Trübung
2. 3,5 $KCl + 1{,}00\ KNO_3$	fein-milchige Trübung	fein-milchige Trübung	8. 3,5 $NaCl + 1{,}00\ Mg(NO_3)_2$	Opalescenz	sehr zarte Trübung
3. 3,5 $KCl + 2{,}00\ KNO_3$	milchige Trübung	milchige Trübung	9. 3,5 $NaCl + 1{,}00\ NH_4NO_3$	opalescent	sehr zarte Trübung
4. 3,5 $KCl + 1{,}00\ Mg(NO_3)_2$	sehr zarte Trübung	zarte Trübung	10. 3,5 $NaCl + 1{,}00\ KCNS$	fast klar	zarte Opalescenz
5. 3,5 $NaCl$	Opalescenz	sehr zarte Trübung	11. 3,5 $NaCl + 1{,}00\ NH_4CNS$	klar	klar
6. 3,5 $NaCl + 1{,}00\ KNO_3$	zarte Trübung	fein-milchige Trübung			

Sämtliche Salze in Substanz zugesetzt.

Kaliumnitrat verstärkt sehr deutlich und proportional der angewandten Menge die fällende Kraft von Kalium- bezw. Natriumchlorid, Magnesiumnitrat übt in der Konzentration 1,00 keinen merklichen Einfluſs aus. Ammoniumnitrat wirkt indifferent, Kalium- und Ammoniumrhodanid hemmen die Kochsalzfällung.

j) KFl bezw. NH_4Fl + $NH_4C_2H_3O_2$, NH_4Cl, NH_4NO_3, NH_4Br, NH_4J, NH_4CNS.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24h		sofort	nach 24h
1. 1,25 KFl	zarte Trübung	fein-milchige Trübung	8. 2,00 NH_4Fl	fein-milchig	fein-milchig
2. 1,25 KFl + 1,00 $NH_4C_2H_3O_2$	fein-milchige Trübung	milchige Trübung	9. 2,00 NH_4Fl + 1,00 $NH_4C_2H_3O_2$	milchig	milchig
3. 1,25 KFl + 1,00 NH_4Cl	zarte Trübung	fein-milchige Trübung	10. 2,00 NH_4Fl + 1,00 NH_4Cl	fein-milchig	fein-milchig (etwas dichter als 8)
4. 1,25 KFl + 1,00 NH_4NO_3	sehr zarte Trübung	fein-milchige Trübung	11. 2,00 NH_4Fl + 1,00 NH_4NO_3	fein-milchig	fein-milchig (etwas dichter als 8)
5. 1,25 KFl + 1,00 NH_4Br	fast klar	fast klar	12. 2,00 NH_4Fl + 1,00 NH_4Br	sehr zarte Trübung	zarte Trübung
6. 1,25 KFl + 1,00 NH_4J	klar	klar	13. 2,00 NH_4Fl + 1,00 NH_4J	fast klar	sehr zarte Trübung
7. 1,25 KFl + 1,00 NH_4CNS	klar	klar	14. 2,00 NH_4Fl + 1,00 NH_4CNS	fast klar	Opalescenz

Sämtliche Salze in Substanz auf 8 ccm Wasser und 2 ccm Eiweiß.

Die Fluoride gehören, wie bei dieser Gelegenheit festgestellt wurde, zu den stärkst fällenden Salzen. Nach dem Fällungswert geordnet gilt die Reihe NaFl (1,00), KFl (1,25), NH_4Fl (2,00). Die Fällungen sind reversibel*).

Ammoniumacetat verstärkt, Brom-, Jod- und Rhodanammonium hemmen die Fällung durch Kalium- und Ammoniumfluorid. Ammoniumchlorid und -nitrat verhalten sich gegen das verschiedenionige Kaliumfluorid indifferent, gegen das gemeinionige Ammoniumfluorid als schwach fällungsbegünstigend.

*) Für praktische Zwecke kommt nur das gut lösliche Kalium- und Ammoniumsalz in Betracht. Die Fluoride können auch als fällungsverstärkende Zusätze Verwendung finden in Fällen, wo Umsetzungen in das schwer lösliche Natriumfluorid ausgeschlossen sind.

k) $(NH_4)_2SO_4 + NH_4Cl$, NH_4Br, NH_4J.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24 h		sofort	nach 24 h
1. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$	zarte Trübung	fein-milchige Trübung	5. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 2,5 NH_4Br	wasser-klar	feinste Opa-lescenz
2. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,00 NH_4Cl	fein-milchige Trübung	stärkere fein-milchige Trübung	6. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,00 NH_4J	zarteste Opa-lescenz	sehr zarte Trübung
3. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 2,5 NH_4Cl	fein-milchige Trübung (stärker als 1 u. 2)	milchige Trübung (stärker als 1 u. 2)	7. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 2,5 NH_4J	wasser-klar	wasser-klar
4. 2,5 $(NH_4)_2SO_4$ + 1,00 NH_4Br	sehr zarte Trübung	zarte Trübung			

Ammonsulfat in entsprechenden Raumteilen einer 5,00-Normallösung, die übrigen Salze in Substanz abgewogen zugesetzt.

Ammonchlorid verstärkt zunehmend mit der Konzentration die Ammonsulfatfällung, Brom- und Jodammonium verhindern die Fällung gleichfalls zunehmend mit der Konzentration. Jodammonium ist ein wirksameres Hemmungsmittel als Bromammonium.

1) $K_2C_4H_4O_6$ + NH_4Cl, NaBr, KBr, NH_4Br, NaJ, KJ, NH_4J, $MgCl_2$, $Mg(NO_3)_2$, $MgBr_2$, NH_4NO_3, NaCNS, KCNS, NH_4CNS, $Mg(CNS)_2$.

Salze	Zustandsänderung		Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24 h		sofort	nach 24 h
1. Kaliumtartrat 2,00	zarte (beinahe fein-milchige) Trübung	fein-milchige Trübung	9. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 $MgCl_2$	zarte Opalescenz	sehr zarte Trübung
2. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NH_4Cl	fein-milchige Trübung	fein-milchige Trübung	10. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 $Mg(NO_3)_2$	fast klar	zarte Trübung
3. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NaBr	fein-milchige Trübung	fein-milchige Trübung (stärker als 1)	11. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 $MgBr_2$	fast klar	fast klar
4. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 KBr	zarte Trübung (wie 1)	fein-milchige Trübung (etwas stärker als 1)	12. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NH_4NO_3	zarte Trübung	fein-milchige Trübung
5. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NH_4Br	Opalescenz	sehr zarte Trübung	13. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NaCNS	opalescent	zarte Trübung
6. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NaJ	klar	sehr zarte Trübung	14. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 KCNS	opalescent	zarte Trübung
7. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 KJ	klar	sehr zarte Trübung	15. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NH_4CNS	klar	fast klar
8. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 NH_4J	klar	sehr zarte Trübung (schwächer als 6 und 7)	16. 2,00 Kalium-tartrat + 1,00 $Mg(CNS)_2$	klar	klar

Alle Salze abgewogen in Substanz zugesetzt, 8 ccm Wasser, 2 ccm Eiweißlösung.

Ammoniumchlorid, Natrium- und Kaliumbromid verstärken, Ammoniumbromid, Natrium-, Kalium-, Ammoniumjodid, Magnesiumchlorid, -nitrat, -bromid, Natrium-, Kalium-, Ammonium- und Magnesiumrhodanid hemmen die fällende Wirkung des Kaliumtartrates. Ammoniumnitrat verhält sich indifferent.

m) $K_3C_6H_5O_7$ + NH_4Cl, $NaBr$, KBr, NH_4Br, NaJ, KJ, NH_4J, $MgCl_2$.

Salze	Zustandsänderung	
	sofort	nach 24^h
1. 1,5 Kaliumcitrat	sehr zarte Trübung	zarte Trübung
2. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 NH_4Cl	zarte Trübung	zarte (fast feinmilchige) Trübung (stärker als 1)
3. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 NaBr	sehr zarte Trübung (etwas stärker als 1)	zarte Trübung
4. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 NaBr	sehr zarte Trübung	zarte Trübung
5. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 NH_4Br	klar	klar
6. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 NaJ	klar	klar
7. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 KJ	klar	sehr zarte Opalescenz
8. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 NH_4J	klar	klar
9. 1,5 Kaliumcitrat + 1,00 $MgCl_2$	sehr zarte Opalescenz	sehr zarte Opalescenz

Alle Salze in Substanz wie im vorigen Versuche.

Ammoniumchlorid, Natriumbromid verstärken, alle übrigen Salze hemmen die Kaliumcitratfällung bis auf Kaliumbromid, welches in der verwendeten Konzentration indifferent erscheint.

Versuchsergebnisse und Grundzüge einer Theorie der Eiweifs-Salzbeziehungen.

Es ist das grofse Verdienst Hofmeisters, in seinen Untersuchungen über die Salzwirkung festgestellt zu haben, dafs das Fällungsvermögen der Salze in bestimmter Weise sowohl von dem sauren als auch von dem basischen Anteile derselben abhängt. Unter Anwendung der Ionenlehre können wir diese Thatsache gegenwärtig folgendermafsen formulieren.

Betrachtet man die nachstehende Tabelle (S. 243), welche in vertikaler Reihe die Anionen nach dem abnehmenden Fällungswerte der zugehörigen Salze, die Kationen nach wachsendem Fällungsvermögen derselben in horizontaler Anordnung enthält, so ergiebt sich, dafs für jedes Anion dieselbe Reihenfolge der Kationen, für jedes Kation dieselbe Ordnung der Anionen bei gleichsinniger Änderung (Wachsen oder Abnehmen) des Fällungseffektes Geltung hat. Die Wirkung der Anionen ist für sich betrachtet in weitem Mafse unabhängig von dem hinzugefügten Kation und umgekehrt. Die eiweifsfällende Eigenschaft eines Elektrolyten setzt sich somit gleich vielen anderen additiv aus der Wirkung der konstituierenden Ionen zusammen.

Aus diesem wichtigen Gesetze folgt zunächst, dafs auch bei der Kombination fällender Elektrolyte der Gesamteffekt der Summe aller einzelnen Ionenwirkungen entsprechen mufs, eine Folgerung, welche sich im Prinzip in sämtlichen Versuchen (a bis f) bestätigt hat. Zugleich zeigte sich, dafs bei den angewendeten Konzentrationen neben dieser Summierung der Einzeleffekte gleichzeitige Dissoziationsänderungen keinen so erheblichen Einflufs entfalten, dafs die Resultate qualitativ geändert würden. So hat im Versuche a das Zusammenwirken des fällenden Natriumacetats mit den Chloriden keine auffallende Veränderung erfahren, sobald das Kaliumchlorid durch Natriumchlorid ersetzt wurde, welches als Salz mit dem gemeinschaftlichen Na-Ion die Dissoziation des Acetats herabsetzt. Für die ausnahmslos im Sinne einer Verstärkung des Fällungsvermögens ausfallenden Versuche kann auch ein Bedenken nicht in Betracht kommen — die durch den Zusatz des zweiten Elektrolyten entstehende Raumvermehrung. Diese müfste, wiewohl sehr gering im Vergleiche zum Volum der mit einem einzigen Elektrolyten in wirksamer Konzentration versetzten Lösung, stets im Sinne einer feineren Verteilung des Niederschlages wirken, dessen Dichte um so mehr abnimmt, je

gröfser der Salzzusatz ist. In Wirklichkeit ist jedoch das Gegenteil der Fall.

Es giebt aber eine Reihe von Ausnahmen unter den Salzen, bei welchen die fällende Wirkung ausbleibt, wiewohl eine solche nach dem Anteile, den ihre Ionen in anderen Elektrolyten am Fällungsvermögen besitzen, erwartet werden müfste. So stehen sich Kalium- und Natriumsalze in Bezug auf ihre fällenden Eigenschaften sehr nahe, während unter den stark fällenden Sulfaten das Kaliumsulfat Eiweifs nicht niederschlägt. Ähnliches gilt für die Kaliumsalze der schwächer fällenden Chlorate und Nitrate. Nach Hofmeisters Annahme reicht in diesen Fällen die Löslichkeit der Salze nicht aus, um die Herstellung wirksamer Konzentrationen zu ermöglichen.

Man kann diese auf eine einfache Berechnung gestützte Erklärung in zweierlei Weise experimentell prüfen, indem man entweder übersättigte Lösungen dieser Salze verwendet, da sich dieselben durch eine mit der Temperatur rasch wachsende Löslichkeit auszeichnen, oder man bedient sich dieser Salze als Zusätze zu fällenden Elektrolyten, deren Sättigung unter dem Fällungswerte gelegen ist. Beide Wege wurden eingeschlagen.

Es wird durch Kochen in einer Eprouvette eine etwa 20 proz. Kaliumsulfatlösung hergestellt und, nachdem etwas warmes Öl daraufgeschichtet worden, das Reagenzröhrchen in ein mit einem Thermometer adjustiertes gröfseres Becherglas mit Wasser von 100° C. eingebracht, dann das Ganze allmählich auf 50° C. abkühlen gelassen. Schichtet man nun vorsichtig unter dem Öl Eiweifslösung über das Salz, dann tritt sofort Ringbildung und schliefslich milchige Trübung der ganzen Flüssigkeit ein. Man kann sich an einer behutsam entnommenen Probe überzeugen, dafs diese Zustandsänderung bei Verdünnung reversibel ist, wobei gleichzeitig das überschüssige Salz auskrystallisiert.

Mit KNO_3, welches in heifsem Wasser $^{200}/_{100}$, in kaltem $^{25}/_{100}$ löslich ist, gelang der Versuch nicht, wiewohl die Herstellung einer bis auf 46° C. unterkühlten Lösung möglich war.

Es liefs sich also durch Verwendung einer übersättigten Lösung ohne weiteres die fällende Eigenschaft des Kaliumsulfats nachweisen, bei Kaliumnitrat versagte dieses Verfahren; es könnte also hier das ungenügende Fällungsvermögen durch andere Umstände bedingt sein.

Dafs dieses und viele andere nicht fällende Salze dennoch einen nur dem Grade nach zu geringen Fällungswert besitzen, tritt bei einer viel empfindlicheren Versuchsanordnung hervor, bei der

Vereinigung mit einem unter der Fällungsgrenze konzentrierten, eiweifsniederschlagenden Salze. Es resultiert dann bei passend gewählten Zusatzmengen des nicht fällenden Salzes eine Kombination von oft sehr beträchtlichem Fällungsvermögen. Auf diese Weise liefsen sich (siehe Vers. h bis m) die fällenden Eigenschaften an den Salzen Ammoniumchlorid, Kaliumnitrat, Natrium- und Kaliumbromid beim Zusammenwirken mit Kalium-, Natriumchlorid, Ammoniumsulfat, Kaliumtartrat, Kaliumcitrat darthun. Auch dieses Fällungsvermögen wächst, wie zu erwarten, mit der Konzentration und wird bei sehr geringem Sättigungsgrade nicht merklich, so dafs z. B. Zusatz von 1,0 Kaliumbromid zu Kaliumcitrat indifferent erscheint.

Bei diesen Versuchen wirken wohl einige Umstände mit, welche die Resultate beeinflussen, wie sich jedoch herausgestellt hat, nicht so weit verändern, dafs nicht die spezifische Ionenwirkung deutlich bliebe und regelmäfsig wiederkehre. Die störenden Nebenerscheinungen können teils von Dissoziationsänderungen der reagierenden Salze, teils von Variationen des Gesamtvolumens durch die hinzugefügten Elektrolyte herrühren.

Die Dissoziationsverminderung, welche bei Zusatz von Salzen mit einem gemeinschaftlichen Ion, beispielsweise in Versuch g Natriumchlorid mit Ammoniumchlorid, Magnesiumchlorid Natriumbromid und Natriumjodid eintritt, kann ihren Einflufs zweifach entfalten: durch Verringerung der wirksamen freien Ionen und durch die Änderung der Beziehungen zwischen Lösungsmittel und elektrisch neutralen Molekülen. Eine Vermehrung der letzteren wird im allgemeinen zu einer stärkeren „Bindung“ von Lösungsmittel führen. Diese zwei Faktoren müssen übrigens, wie aus den späteren Ausführungen über die Art der Ionenwirkung hervorgehen wird, nicht notwendig in einem Sinne wirken.

Auf eine solche Verdeckung der eigentlichen Ionenwirkung wäre die Abweichung zu beziehen, die das Magnesiumchlorid zeigt, indem es sich nur mit den gemeinionigen Salzen Chlorkalium, Chlornatrium kombiniert als Fällungvermehrer erweist.

Die Versuche sind derart eingerichtet, dafs die Salzwirkung sowohl in Kombination mit gemeinschaftlichen als auch mit verschiedenen Ionen geprüft wurde. So tritt die Fällungsverstärkung durch Kalium- und Natriumbromid bei Zusammenwirken mit Kalium- und Natriumchlorid stets in dem gleichen Sinne hervor, wiewohl sich bei jedem der möglichen Salzpaare die Dissoziationsverhältnisse abwechselnd ändern. Das Gleiche zeigt das Verhalten

des Kaliumnitrats gegen Kaliumchlorid und Natriumchlorid. Beispiele dieser Art, welche den dominierenden Einfluſs der spezifischen Ionenwirkung gegenüber anderen Variationen der Bedingungen erkennen lassen, können in gröſserer Zahl den Versuchstabellen entnommen werden.

Da sämtliche Zusätze im Sinne einer Verteilung des Eiweiſsniederschlages auf einen gröſseren Raum wirken, so kann dieser Umstand die Annahme einer fällenden Salzwirkung bei Verstärkung des Niederschlages nur noch mehr unterstützen.

Alle bisher angeführten Thatsachen werden aus zwei Voraussetzungen verständlich: die Salzwirkung auf Eiweiſskörper ist eine additive Ioneneigenschaft, und in den Fällen, wo eine fällende Wirkung ausbleibt, ist die Summe der Ionenwirkungen zu gering, um zur Geltung zu kommen. Dabei ist stillschweigend seither stets angenommen worden, daſs beide Anteile des Salzes fällend wirken, so daſs diese Eigenschaft die Summe zweier *positiver* Gröſsen, der Fällungswerte der beiden Ionen darstellt. Diese Annahme bildete das Hindernis für eine vollständigere Erkenntnis der Wechselbeziehungen von Eiweiſs und Salzen.

Es giebt zunächst eine Reihe von Elektrolyten, wie die Acetate, Nitrate, Chloride von NH_4 und Mg, mit welchen trotz zureichender Löslichkeit eine fällende Wirkung nicht zu erzielen ist, und diese Thatsache bleibt, wenn wir nicht auf unbekannte konstitutive Umstände zurückgehen, unverständlich, wenn man daran festhält, daſs es sich um die Summierung zweier positiver Ioneneigenschaften handelt. Denn es muſs völlig paradox erscheinen, daſs beispielsweise NH_4 im Ammonsulfat fällend wirken soll und im Ammoniumacetat nicht, während zugleich das Acetation im Natriumsalz der Essigsäure als fällendes Ion gilt. Aus der folgenden Tabelle, welche fällende (+) und nicht fällende (—) Salze enthält, lassen sich unschwer analoge Beispiele entnehmen.

(Tabelle s. folgende Seite.)

Die Wahrnehmung, daſs das Hinzufügen eines Ions in dem einen Elektrolyten, z. B. des $\overset{+}{N}H_4$ zu $\overset{-}{S}O_4$, einen positiven Wirkungswert, in einem anderen einen negativen Effekt giebt, z. B. des $\overset{+}{N}H_4$ zu $\overset{-}{N}O_3$, legt bei Festhalten an dem Gesetze der additiven Ionenwirkung die Ansicht nahe, daſs es sich um die algebraische Summierung *antagonistischer* Eigenschaften der entgegengesetzt geladenen Ionen handelt, während sie schlechterdings unvereinbar ist mit der wechselseitigen Ergänzung in einer und derselben Rich-

Kationen → Anionen ↓	1 Mg	2 NH_4	3 K	4 Na	5 Li
I. Fluorid	n. u.	+	+	+	n. u.
II. Sulfat	+	+	+	+	+
III. Phosphat	n. u.*)	+	+	+	n. u.
IV. Citrat	n. u.	+	+	+	n. u.
V. Tartrat	n. u.	+	+	+	n. u.
VI. Acetat	—	—	+	+	n. u.
VII. Chlorid	—	—	+	+	+
VIII. Nitrat	—	—	—	+	+
IX. Chlorat	n. u.	—	—	+	n. u.
X. Bromid	—	—	—	—	+
XI. Jodid	n. u.	—	—	—	n. u.
XII. Rhodanid	—	—	—	—	n. u.

tung wirkender Valenzen **). Diese Auffassung beseitigt mit einem Schlage alle Schwierigkeiten, welche einer Erklärung der Abweichungen von den bisher als gültig angenommenen Fällungsregeln im Wege standen, und besitzt den Vorzug, die Beziehungen der Eiweifskörper zu allen Salzen, nicht nur zu den fällenden zu umfassen.

Indem wir die später zu begründende Annahme vorwegnehmen, dafs die Kationen fällende, die Anionen die Fällung hemmende Ionen sind, wäre die obige Tabelle in der folgenden Weise zu betrachten. In der Horizontalen sind die Kationen von Magnesium bis zum Lithium nach wachsenden Fällungswerten geordnet, in der Vertikalreihe folgen die Anionen von $\bar{Fl}$ und $S\bar{O}_4$ bis $C\bar{N}S$ nach wachsendem Hemmungsvermögen. Bei Acetat und Chlorid wird bereits das schwächere Fällungsvermögen des $\overset{+}{Mg}$ und $N\overset{+}{H}_4$ aufgehoben, von dem stärker hemmenden $N\bar{O}_3$ und $Cl\bar{O}_3$ wird aufser $\overset{+}{Mg}$ und $N\overset{+}{H}_4$ auch $\overset{+}{K}$ unwirksam gemacht, von dem noch mehr fällungswidrigen $\bar{Br}$ werden alle Kationen bis auf das stärkst wirksame Lithium, von $\bar{J}$ und $C\bar{N}S$ sämtliche untersuchten Metallionen überwunden.

*) n. u. = nicht untersucht.

**) Bei der Erkenntnis der Gegenwirkung der Ionen auf gelöstes Eiweifs hat mich die Analogie mit dem Verhalten des Lichtes wesentlich gefördert. Hier hat bekanntlich die Entdeckung der Interferenz — des Umstandes, dafs Licht und Licht zusammen Dunkel geben kann — der Undulationstheorie, der Lehre vom Bestehen „antagonistischer Abschnitte“ im Lichtstrahle, zum endgültigen Siege über die Emissionshypothese verholfen.

Es lassen sich jedoch aus dem Gesetze von der Gegenwirkung der Ionen auf in Lösung befindliches Eiweifs weitere Folgerungen ableiten, welche der Versuch bestätigt.

Bezeichnen wir mit $f, f', f'' \ldots$ die Fällungswerte einer Reihe von Kationen, mit $h, h' h'' \ldots$ die Hemmungswerte einer Reihe von Anionen, dann werden bei Kombinationen von Elektrolyten die folgenden drei Fälle möglich sein:

$$\Sigma\,(f, f', f'' \ldots) \gtreqless \Sigma\,(h, h', h'' \ldots).$$

Es kann also aufser den Salzen, welche, fällenden Elektrolyten zugesetzt, deren Eiweifsabscheidungsvermögen steigern, noch indifferente und schliefslich solche geben, die Fällungen verhindern, eventuell entstandene Niederschläge wieder zur Lösung bringen. Solche fällungswidrigen Elektrolyte, in denen die Hemmungswirkung des Anion das Koagulationsvermögen des Kation überwiegt, müssen sich zugleich aus der obigen Tabelle in gesetzmäfsiger Weise ableiten lassen. Hat man etwa in einer Horizontalreihe ein indifferentes Salz bestimmt, dann mufs das nebenstehende Salz mit dem schwächer fällenden Kation bereits niederschlaglösende Eigenschaften besitzen. Ebenso kann man erwarten, dafs das in der Vertikalreihe unterhalb stehende Salz desselben Kation mit dem stärker hemmenden Anion die Niederschlagsbildung mehr oder weniger hindert. Diese Voraussage hat sich, soweit die Salze zur Verfügung standen, stets erfüllt.

Auf diese Weise wurde z. B. in der Horizontalreihe VI (s. Tabelle S. 243 und die Versuche h bis m) gefunden, dafs nach dem fällenden Natrium- und Kaliumchlorid das schwach fällungbegünstigende Ammoniumchlorid und auf dieses Magnesiumchlorid folgt, welches bereits fällungswidrig wirkt. Ähnliches gilt für das eiweifsfällende Lithium- und Natriumnitrat, das fällungsteigernde Kaliumnitrat und das in schwachen Konzentrationen indifferente, in starken lösende Magnesiumnitrat u. s. w.

Ebenso zeigte sich beispielsweise in der Vertikalreihe 3, dafs unter dem fällenden Kaliumchlorid das fällungbegünstigende Kaliumnitrat steht, dem das nahezu indifferente Kaliumbromid und schliefslich das lösende Kaliumjodid und -rhodanid folgen; von den Ammoniumsalzen löst bereits das Bromid u. s. f.

Wie zu erwarten, wächst gleich der eiweifsfällenden Eigenschaft auch die fällungswidrige Wirkung mit der Konzentration. Das Bedenken, dafs die Elektrolyte durch die Raumvermehrung den Eiweifsniederschlag verdünnen, läfst sich durch eine Versuchsanordnung leicht zerstreuen, bei welcher die Volumvermehrung für eine Reihe verschieden wirkender Zusätze von annähernd gleicher Gröfse ist. Es gelingt sogar, bei stärker fällungswidrigen Salzen

die eiweifslösenden Eigenschaften der Zusätze ohne Änderungen des Gesamtvolumens sichtbar zu machen. Auch hinsichtlich eintretender Dissoziationsänderungen konnten die Versuche so angeordnet werden, dafs die spezifischen Ionenwirkungen unabhängig von der Verwendung gemein- oder verschiedenioniger Salze unverkennbar hervortraten.

Die angeführten Ergebnisse stützen zunächst eine schon früher [1]) auf Grund von Versuchen über die Löslichkeitsbedingungen des Eiglobulins und über die Hitzegerinnung ausgesprochene Anschauung, dafs beide Salzionen mit gelöstem Eiweifs mehr oder minder lockere Verbindungen eingehen. Sie stehen auch in Einklang mit der zuerst von Spiro und Pemsel [3]) anläfslich von Studien der Säure- und Basenkapazität geäufserten Vermutung, dafs die Eiweifskörper amphotere Elektrolyte sind.

Sichergestellt dürfte nunmehr sein, dafs die Salzwirkung auf Eiweifskörper, trotz der unvollständigen Dissoziation der hoch konzentrierten Salzlösungen, in ihrem Hauptanteile additiv aus den Ioneneffekten hervorgeht und dafs diese nicht als gleichsinnige, sondern als antagonistische Gröfsen betrachtet werden müssen. Unberührt bleibt von unseren Versuchen vorläufig die Frage nach dem Wesen des Fällungsvorganges, worüber Bredig [4]) sehr ansprechende Vorstellungen entwickelt hat, und die Thatsache, dafs die Fällung an eine von der Natur der Salzionen und der Eiweifskörper bestimmte Konzentration, die Fällungsgrenze, geknüpft ist.

Aus der Betrachtung der Tabelle (S. 243) ergiebt sich, dafs die Resultate auch entwickelt werden könnten aus fällenden Eigenschaften der elektronegativen und lösenden der positiven Ionen. Die Gründe, welche einstweilen für die (von uns gemachte) entgegengesetzte Annahme sprechen, sind einmal das Verhalten von Säuren und Basen gegen native Eiweifskörper. Die ersteren, denen das elektropositive H-Ion gemeinsam ist, sind Eiweifsfällungsmittel, die Laugen mit dem elektronegativen OH-Ion Lösungsmittel für Eiweifskörper. In dem gleichen Sinne lassen sich die Beobachtungen an den stark fällenden Schwermetallsalzen verwerten, über welche eingehende Untersuchungen in den folgenden Mitteilungen beigebracht werden sollen. Bei dieser Gelegenheit wird auch die Rolle der elektrolytischen Dissoziation bei der Eiweifsfällung, deren Bedeutung wir selbst früher neben der damals nicht in ihrem vollen Umfange erkannten spezifischen Ionenwirkung übermäfsig in den Vordergrund gestellt hatten, näher gewürdigt werden können.

Die Lehre von der Gegenwirkung der Ionen bei den Zustandsänderungen der Eiweifskörper scheint, soweit das geringe vorliegende Material reicht, einer gröfseren Ausdehnung und Anpassung fähig. V. Rothmund[5]) fand ohne Kenntnis früherer Arbeiten (Hofmeister, ich) für die Löslichkeit von Phenylthiokarbamid bei Gegenwart einiger Neutralsalze, dafs dessen Löslichkeitsherabsetzung additiv von den Salzionen abhänge. Das Ammoniumnitrat bildete insofern eine Ausnahme, als es die Löslichkeit des untersuchten Stoffes steigerte, ein Verhalten, welches nach der angeführten Theorie seine Fremdartigkeit verliert. Bei der Untersuchung über die Hitzegerinnung von Eiweifs unter dem Einflusse von Neutralsalzen hatte ich bereits früher Kurven mit Inflexionspunkten erhalten und diese Bildung eines Maximums als Interferenzerscheinung antagonistischer Wirkungen aufgefafst.

Über die Wechselwirkung von Elektrolyten und Nichtelektrolyten bei der Eiweifskoagulation liegen abgeschlossene Versuche vor, die gemeinschaftlich mit Herrn Dr. Peter Rona ausgeführt wurden und demnächst zur Veröffentlichung gelangen. Aus allen diesen Untersuchungen haben sich auch bemerkenswerte Aufklärungen über die Wirkungsgesetze der Salze im Organismus gewinnen lassen.

Wien, Juli 1902.

Litteratur.

[1]) Pauli, Die physikalischen Zustandsänderungen der Eiweifskörper. Pflügers Archiv 78, 315.

[2]) Friedenthal, Über die Reaktion des Blutserums der Wirbeltiere und die Reaktion der lebendigen Substanz im allgemeinen. Zeitschr. f. allg. Physiologie 1, 56.

[3]) Spiro und Pemsel, Über Basen- und Säurekapazität des Blutes und der Eiweifskörper. Zeitschr. f. physiol. Chemie 26, 233.

[4]) Bredig, Anorganische Fermente, Leipzig, 1901, S. 15.

[5]) V. Rothmund, Zeitschr. f. physikal. Chemie 33, 401.

XI.

Über die Verteilung der Kohlensäure im Blute.

Zweite Mitteilung.

Von Dr. **Eugen Petry,** klinischem Assistenten.

(Aus der Grazer medizinischen Klinik.)

Wenn nach längerer Entwickelung ohne gegenseitige Einflufsnahme die Lehren eines Wissensgebietes durch jene eines zweiten unerwartete Aufklärung erfahren haben, tritt nicht selten das Bestreben hervor, das erstere Gebiet womöglich ganz in letzteres aufgehen zu lassen. Aus ähnlicher Überschätzung einer vermeintlich alles aufklärenden Beziehung erklärt sich auch das leichte Hinweggehen jener Autoren, welche in jüngster Zeit die Frage der Permeabilität der Blutkörperchen behandelt und eine Erklärung der durch Kohlensäure sowie durch andere Säuren und durch Alkalien im Blute hervorgerufenen Erscheinungen versucht haben, über Thatsachen, die sich in betreff der Verteilung der Kohlensäure auf Erythrocyten und Blutflüssigkeit bei direkten chemischen Analysen und Serumvolumbestimmungen ergeben haben.

Läfst man einschlägige Untersuchungen von Gryns*), Hedin**) Overton***) und Oker-Blom†), gegen welche teilweise grundsätzliche Einwendungen möglich sind, hier aufser Betracht, so haben

*) Pflügers Arch. 63, 86.

**) Ebenda 68, 229 und 78, 525.

***) Vierteljahrschr. d. naturforsch. Gesellsch. zu Zürich 1895, S. 159 und Zeitschr. f. physiol. Chem. 22, 189.

†) Pflügers Arch. 79, 111 und 81, 167.

insbesondere Koeppe*) und Hamburger**), sich anlehnend an einen Gedanken Ostwalds***), dafs Membranen nicht für Salze als solche, sondern blofs für deren Ionen permeabel sein könnten, und auf den von Gürber†) erbrachten Nachweis, dafs Chlor nicht als Salz in die Blutkörperchen wandert, vielmehr die Alkalimetalle an dieser Bewegung gar nicht beteiligt sind, sowie auf ein reiches eigenes Beobachtungsmaterial gestützt, hinsichtlich des Problems der Permeabilität der Blutzellen den Boden der Ionentheorie betreten. Dieselben nehmen an, dafs, sobald gewisse Stoffe die Erythrocyten verlassen, eine damit isotonische Menge anderer Stoffe in sie eindringt, dafs also jeglicher Austausch in isotonischen Verhältnissen stattfindet. Für Salze oder Säureradikale seien die Blutkörperchen nicht durchlässig, sondern lediglich für Ionen, und zwar, soweit es sich um Alkalisalze handelt, nur für Anionen derselben. Die Überwanderung eines Ion wäre somit nur dann möglich, wenn ein gleichnamiges anderes an dessen Stelle tritt. Hinsichtlich der Durchlässigkeit der Erythrocyten für Cl'- und CO_3''-Ionen stimmen Koeppe und Hamburger überein. Dagegen glaubten Koeppe, sowie Willerding††) deren Impermeabilität für SO_4''- und für NO_3'-Ionen nachweisen zu können, während Hamburger die Blutkörperchen durchlässig annimmt für diese letzteren und noch für sehr zahlreiche andere elektronegative Säure-Ionen. Den Umfang, in welchem diese Permeabilität zum Ausdruck kommt, läfst er in hohem Mafse abhängig sein von der in den Erythrocyten jeweilig vorhandenen Kohlensäuremenge, gegen welche die erwähnten Anionen wechselseitig diffundieren.

Sind diese Aufstellungen alle richtig, dann mufs (mit gewissen hier nicht weiter erörterten Beschränkungen) ein Austausch der Anionen von Serum und Körperchen nach beiden Richtungen in äquivalenten Mengen (Ersatz aller zweiwertigen durch je zwei einwertige Ionen) erfolgen, sobald irgendwie das Gleichgewicht der Konzentrationen auf einer der beiden Seiten gestört ist, weil ja

*) Archiv für Anatomie und Physiologie 1895, S. 154 und Pflügers Arch. 67, 189.

**) H. J. Hamburger, Osmotischer Druck und Ionenlehre, I, Wiesbaden 1902. Daselbst Verzeichnis und Inhaltsangabe aller früheren Arbeiten dieses Forschers.

***) Zeitschr. f. physikal. Chem. 6, 71.

†) Sitzungsberichte der med.-physikal. Gesellsch. Würzburg, 1895, 25. Febr.

††) Willerding, Hamburgers Blutkörperchenmethode in ihren Beziehungen zu den Gesetzen des osmotischen Druckes, Giefsener Diss. 1897.

einem Ausgleich des Unterschiedes der Partialdrücke kein Hindernis im Wege steht. Bei Zufuhr von Kohlensäure und anderen Säuren zum Blute wird insbesondere die Wanderung von Cl'-Ionen hier in Betracht kommen. Ohne weiteres wird aber natürlich die Erklärung von Koeppe und Hamburger für den Austausch jedes CO_3''-Ion gegen zwei Cl'-Ionen, welche sich ursprünglich auf eine Suspension von Erythrocyten in Chlornatriumlösung bezieht, auf das Gesamtblut nicht anwendbar sein, weil dessen Serum von viel komplizierterer chemischer Zusammensetzung ist und z. B. ebenso wie die Blutkörperchen eine grofse CO_2-Kapazität besitzt. Würden wirklich die Erythrocyten von den zugeführten Anionen mehr aufnehmen, so wäre ein nachträglicher Übertritt derselben nach dem Serum im Zusammenhang mit einem Austausch von Cl'-Ionen allerdings wahrscheinlich, welch letztere ja im Serum in gröfserer Menge vorhanden sind. Zur Beurteilung der Verhältnisse im gegebenen Falle kommt es also stets zunächst auf die Entscheidung der Frage an, welcher Blutbestandteil von der herantretenden Säure thatsächlich stärker gesättigt erscheint. Läfst sich z. B. bei Zufuhr von Kohlensäure zum Blute das Serum als das CO_2-Depot analytisch sicher nachweisen, so wird Koeppes Auffassung zweifelhaft und eine andere Erklärung der beobachteten Chlorwanderung wünschenswert. Ferner mufs ein vollkommenes Aus- oder ein sehr starkes Zurückbleiben der Chlorbewegung bei Beschickung von Blut mit irgend welchen Anionen nicht ausschliefslich davon herrühren, dafs die Wandung der Blutscheiben für die letzteren in einer der beiden Richtungen impermeabel ist; es könnte ebenso gut auch darin begründet sein, dafs sich die betreffende Säure gleichmäfsig auf Körperchen und Serum verteilt hat.

Für Kohlensäure hatten schon Al. Schmidt*), Zuntz**), Setschenow***) u. L. Frédéricq†) angegeben, dafs beim Durchleiten dieses Gases durch Blut, bezw. in gewöhnlichem (defibriniertem oder ungeronnenem) Blut das Serum stärker gesättigt ist als die Körperchen. Den absoluten Gehalt beider Blutbestandteile an Kohlensäure, dessen Ermittelung die Bestimmung der Volumprozente des Blutes an Körper-

*) Berichte der kgl. sächs. Gesellsch. der Wissensch., mathem.-physikal. Klasse 19, 30.

**) Centralbl. f. die med. Wissensch. 1867, S. 529.

***) Mémoires de l'acad. impér. des sciences de St. Pétersbourg, sér. VII, t. XXVI, No. 13.

†) L. Frédéricq, Recherches sur la constitution du plasma sanguin, Gand 1878.

chen und Serum voraussetzt, hat unter verschiedenen Versuchsbedingungen zuerst Kraus*) festgestellt. Obwohl sich die Alkaleszenz [„native" Alkaleszenz im Sinne von Spiro**)] im defibrinierten Rinderblut meist gerade entgegengesetzt verhält, kommt hier der Kohlensäuregehalt der Körperchen nur ausnahmsweise den Werten der Serumkohlensäure besonders nahe. In der Regel ist derselbe sehr merklich niedriger. Die Differenz des Gehaltes, auf die Volumeinheit Serum und Erythrocyten bezogen, kann über 20 Proz. betragen. Bringt man die Kohlensäuregehalte verschiedener Gesamtblute in eine steigende Reihe, so erscheinen die Kohlensäuregehalte der Sera fast ohne Ausnahme in derselben Anordnung. Auch das Serum von Pferden, sowie dasjenige gesunder und kranker Menschen pflegt sehr merklich kohlensäurereicher zu sein. Indem er ferner Blut nach verschiedenen Verhältnissen mit dem durch Centrifugieren gewonnenen eigenen Serum verdünnte, erzeugte Kraus Blutmischungen, welche im ganzen weniger überschüssige basische Äquivalente, aber absolut mehr Kohlensäure enthielten, und fand, dafs der Kohlensäuregehalt des Serums der verschiedenen Mischungen der gleiche blieb. Endlich stellte Kraus noch eine Anzahl von Versuchen an, in denen das vom Cruor durch Centrifugieren getrennte Serum zunächst für sich in verschiedenen Verhältnissen kohlensäurereicher gemacht und erst dann wieder mit seinen Körperchen vereinigt wurde. Bei physiologisch in Betracht kommendem Kohlensäurezuwachs waren die Erythrocyten dabei vor- und nachher prozentisch ungefähr gleich reich an Kohlensäure; sämtliche oder fast sämtliche zugeführte Kohlensäure kann, durch längerer Zeit, im Serum verbleiben. Die weitgehenden Angaben von Al. Schmidt und von Frédéricq sind allerdings teilweise zu berichtigen. Bei besonders grofsem Kohlensäuregehalt des Blutes (wobei das Serum merklich hämoglobinhaltig zu werden pflegt) kann die Körperchensubstanz sogar etwas kohlensäurereicher werden als das Serum. Indem Kraus daran festhielt, dafs die freien Alkalien zum mindesten einen der mafsgebendsten Kohlensäureträger in beiden Blutbestandteilen darstellen, schienen auch ihm diese Versuche geradezu das Vorhandensein eines Hindernisses nahe zu legen, welches der Kohlensäure nicht sofort gestattet, einfach den gegebenen chemischen Anziehungen folgend, im entsprechenden Verhältnis sich auf Erythrocyten und Serum aufzuteilen. Auf schlechtere Permeabilität der Körperchen für CO_3'' bezieht aber Kraus gegenwärtig dieses Hindernis nicht mehr unbedingt.

Wenn es also vorerst nicht die Blutkörperchen sind, welche bei Zuleitung von Kohlensäure mehr von dem Gase aufnehmen, fällt auch die vermeintliche Tendenz für den Austritt von CO_3''-Ionen in das Serum hinein im Zusammenhang mit einem Austausch von Cl'-Ionen des Serums im Sinne der Koeppeschen Erklärung fort. Gern habe ich es deshalb unternommen, mir aus

*) Fr. Kraus, Über die Verteilung der Kohlensäure im Blute. Festschrift der Universität Graz (November 1897).

**) Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 233.

einem anderen Gesichtspunkte durch eine Reihe eigener Versuche, welche naturgemäfs zum Teil blofs eine Wiederholung früher von anderen Forschern ausgeführter waren, ein Urteil über die „Permeabilität der Blutkörperchen“ für Kohlensäure und andere Säuren, bezw. über die Bedeutung der Kohlensäureeinwirkung zu bilden.

Die Permeabilität der Erythrocyten für Chlor hat Hamburger durch chemische Analysen über allen Zweifel festgestellt. Namentlich hat er gezeigt, dafs Chlor in die Körperchen eindringt, wenn Blut oder Erythrocytensuspensionen mit Kohlensäure behandelt werden, auch wenn man letztere in den Mengen anwendet, welche physiologisch in Betracht kommen. Über die Bedingungen, welche den Umfang dieser Chlorbewegung unter der Einwirkung anderer Säuren beherrschen, und über die eigentliche Natur derselben suchte ich mir deshalb vor allem Klarheit zu verschaffen.

Zur ersten Orientierung wählte ich (das leicht zu erlangende) Rinderblut. Dasselbe wurde jeweils im Schlachthause während der Tötung der Rinder aufgefangen und durch Schlagen mit dem Glasstab bei Luftzutritt defibriniert. Genau abgemessene Blutmengen beschickte ich sodann durch eine halbe bis eine Stunde mit (erst durch eine Silbernitratlösung und hinterher durch konzentrierte Schwefelsäure geleiteter) Kohlensäure in langsamem Strom und in kleinen Blasen. Darauf ist in allen Versuchen der Chlor-Gehalt des Serums, in einer Anzahl der Versuche auch das Volum der körperlichen Elemente ermittelt worden. Zur Kontrolle dienten Proben desselben Blutes, welche ebenso lange mit reinem, trockenem, aus Wasserstoffsuperoxyd und Kaliumpermanganat dargestelltem Sauerstoff (Versuch I bis III, Tab. I) oder mit trockener Luft (Versuch IV) behandelt waren. Das Volum der Kohlensäureproben nahm während der Einleitung des Gases etwas zu (in Vers. II von 410 auf 415 ccm), die Mengen der Sauerstoffproben blieben unverändert.

Nach mehreren Vorversuchen ergab sich nun am zweckmäfsigsten folgende Methode der Chlorbestimmung, welche den von Bunge*) und Hoppe-Seyler**) erhobenen Bedenken vollkommen Rechnung trägt. Es wurden 5 bis 10 ccm Serum in einer entsprechend grofsen Nickelschale mit etwa 60 ccm destillierten Wassers verdünnt, mit zwei Tropfen chlorfreier Essigsäure angesäuert, auf dem Wasserbad bis zur Trockne eingedampft. Die Verdampfung zur Trockne wurde mehrmals mit geringen Mengen Wasser wiederholt, wodurch die eingetrockneten Massen sich vom Boden der Schale ablösen und dann leichter extrahiert werden können. Darauf wurden dieselben mindestens fünfmal mit siedendem Wasser ausgezogen und die Extrakte durch ein aschefreies Filter gegossen. Der Rückstand wurde dann mit etwa

*) Zeitschr. f. Biologie 12.

**) Handbuch der physiol.-chem. Analyse 1883, S. 316.

5 g chlorfreiem Natriumkarbonat (in Lösung) eingedampft, hierauf bei eben noch leuchtender Flamme bis zur vollständigen Verkohlung erhitzt, wieder mehrmals mit siedendem Wasser extrahiert, der Auszug durch das zuerst benutzte aschefreie Filter filtriert, hierauf die zurückbleibende Kohle mit dem Filter vereint in der Schale getrocknet und bei scharf gehender Flamme bis zur völligen Veraschung geglüht. Endlich wurden beide Filtrate mit der Asche in der Schale vereint, eingedampft, bei leuchtender Flamme schwach erhitzt, um die geringe Menge in das erste Extrakt übergegangener organischer Substanz zu zerstören, sodann mit Wasser aufgenommen und durch ein kleines Filter in ein Hundertkölbchen gespült, daselbst mit Volhard-Salpetersäure neutralisiert und der Chlorgehalt nach Volhard bestimmt.

Das Verhältnis zwischen Blutzellensubstanz und Plasma, bezw. das Volum der körperlichen Elemente ermittelte ich nach der Methode von M. und L. Bleibtreu*). Das Verhältnis, in welchem verdünnt wurde, war gewöhnlich 3 Blut zu 2 Chlornatriumlösung. Die dem Serum isosmotische Salzlösung wurde auf Grund der Bestimmung des Gefrierpunktes des Serums mit dem Beckmannschen Apparate ausgewählt. Ferner wurde bei Ausführung des Bleibtreuschen Verfahrens stets die Stickstoffbestimmung (Kjeldahl) zu Grunde gelegt. Es braucht wohl kaum darauf hingewiesen zu werden, dafs alle hieraus berechneten Werte mit einem etwas gröfseren Fehler behaftet sind als die analytisch gefundenen Chlorgehalte des Serums. Die Gröfse dieser Fehler übersteigt noch diejenige der Methode von Bleibtreu selbst (unter 3 Proz.). Alle Versuche, mit dem Hämatokriten von Koeppe genaue Resultate zu erlangen, schlugen fehl.

Tabelle I.

Versuch	Chlor im Blut		Chlor im Serum		Körperchen-volum		Gefrier-punkt		N-Gehalt	
	Kontr. Proz.	CO_2 Proz.	Kontr. Proz.	CO_2 Proz.	Kontr. Proz.	CO_2 Proz.	Kontr.	CO_2	Kontr. Proz.	CO_2 Proz.
I	0,50	0,495	0,60	0,60	—	—	0,520	0,54	—	—
II	0,51	0,50	0,60	0,59	39,0	39,9	0,505	0,51	1,218	1,239
III	—	—	0,625	0,55	—	—	—	—	—	—
IV	0,47	0,44	0,59	0,58	43,7	45,7	—	—	1,138	1,183

Tabelle II (zu Vers. III).

	Sauerstoffserum	CO_2-Serum
Trockensubstanz . . .	8,906 Proz.	9,012 Proz.

*) Pflügers Archiv 51, 151.

Ausgesprochene Übereinstimmung mit den einschlägigen Angaben von Hamburger und v. Limbeck*) zeigen die Chlorwerte in Versuch III, in welchem der Chlorgehalt des Serums durch die Behandlung mit Kohlensäure um 12 Proz. vermindert erscheint. Dafs hier die Menge der übrigen festen Stoffe im Serum vermehrt war, beweist die Untersuchung der Trockenrückstände beider Sera, deren Resultat in Tabelle II zu ersehen ist. Die übrigen drei Versuche hingegen ergaben eine Übereinstimmung mit den Erfahrungen jener beiden Forscher nicht. In Vers. IV und II beträgt der Unterschied 1,6 Proz. des Analysenwertes, fällt also mit Rücksicht auf die bei den einzelnen Analysen gefundenen geringen Chlormengen (0,06 g) in die Fehlerbreite. In Vers. I war der Gehalt beider Vergleichssera an Chlor überhaupt identisch. Das Körperchenvolum erwies sich in Vers. II gleichfalls in beiden Proben völlig übereinstimmend (Diff. 0,1 Proz.), auch in Vers. IV liegt die Differenz (2 Proz.) innerhalb der Fehlergrenzen der Bleibtreuschen Methode.

Den Grund dafür, dafs bei drei von vier Versuchen ein Eindringen von Chlor in die Rindererythrocyten sich nicht nachweisen liefs, könnte man mit Hamburger vielleicht darin suchen, dafs ich mit „normalen" und nicht mit schon zuvor speziell kohlensäurereich gemachten Blutkörperchen arbeitete: der Ionenaustausch wäre unter solchen Umständen zu schwach zur Gewinnung eines zuverlässigen Urteils aus quantitativen Chlorbestimmungen. Aber diese letztere Auffassung selbst beruht ja blofs auf der mit den Thatsachen nicht in Einklang stehenden Voraussetzung, dafs von Anfang an die Erythrocyten bei Zuleitung von Kohlensäure zum Blute mehr von dem Gas aufnehmen, und dafs infolgedessen die Tendenz entsteht für ein Austreten von CO_3''-Ionen in das Serum im Zusammenhang mit einer Auswechselung von Cl'-Ionen aus dem Serum. Eine von der wirklich zu beobachtenden Verteilung der Kohlensäure auf Körperchen und Blutflüssigkeit beim Einwirken dieses Gases auf Blut ausgehende Betrachtungsweise wird dagegen zu dem Schlusse gelangen müssen, dafs (vielleicht im Widerspruch mit dem Verhalten des Plasmas der Menschen, Pferde und Kaninchen, welches Hamburger und v. Limbeck bei ihren Versuchen benutzt haben) entweder im natürlichen Serum der Rinder Bedingungen gegeben sind, welche einer Chlorfortwanderung hinderlich im Wege stehen, oder dafs gerade die Rinderblutkörperchen vergleichsweise nicht so gut für Chlor permeabel sind.

Zur Entscheidung dieser Frage schwemmte ich in sechs Versuchen (Vers. VI bis XI in Tabelle III) Rindererythrocyten nach mehrmaliger Waschung mit isosmotischer Chlornatriumlösung (durch Centrifugieren

*) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 35, 309.

Tabelle III.

Versuchszahl	Blut vom	vor	nach
VI	Rind. 5 mal gewaschen, 1/2 Stde. mit CO_2 behandelt	0,951 Proz. NaCl	0,849 Proz. NaCl
VII	Schwein. 4 mal gewaschen, 1/2 Stunde CO_2	0,800 „ „	0,665 „ „
VIII	Rind. 1/2 Stunde durchgeleitet	0,775 „ „	0,67 „ „
IX	Rind. 25 Minuten „	0,921 „ „	0,777 „ „
X	Schwein. 1/2 Stunde „	0,933 „ „	0,835 „ „
XI	Schwein. 3/4 Stunde „	0,952 „ „	0,867 „ „

bewerkstelligt) in letzterer auf und behandelte eine Probe der Suspension sodann durch einige Zeit (10 Minuten, 1/4 Stunde) mit Kohlensäure. Sehr bald tritt unter diesen Umständen Dunkelfärbung des Gemisches ein, und sehr leicht kommt es dazu, dafs die Körperchen etwas Farbstoff an die Aufsenflüssigkeit abgeben.

Vergleicht man die, wie man sieht, durchgehends stark positiven Ergebnisse der letzteren Versuche, in welchen die Erythrocyten gleichfalls nicht vor der Suspendierung in Kochsalzlösung kohlensäurereicher gemacht worden waren, mit den Resultaten der in Tab. I zusammengestellten, so erscheint es festgestellt, dafs im künstlichen Serum unter dem Einflusse zugeleiteter Kohlensäure eine Chlorwanderung viel leichter, regelmäfsiger und ausgiebiger eintritt als im nativen Blutserum. Den Rindererythrocyten geht somit die Fähigkeit, Chlor durchzulassen, durchaus nicht ab, die früher beobachteten hemmenden Momente für eine Wanderung des Chlors im natürlichen Blut scheinen vielmehr im Plasma zu liegen. In Vers. X liefs sich überdies nachweisen, dafs die Körperchen am Ende eines solchen Versuches noch nicht völlig mit Chlor gesättigt zu sein brauchen, denn der abcentrifugierte Erythrocytenbrei nahm hier bei nochmaliger Aufschwemmung in isosmotischer Kochsalzlösung und neuerlicher Behandlung mit Kohlensäure eine Chlormenge auf, welche einer Konzentrationsdifferenz von 0,108 Proz. NaCl im künstlichen Serum entsprach.

Um noch die Möglichkeit des Zustandekommens der Chlorverminderung im (künstlichen) Serum durch Wasserabgabe an letzteres von seiten der Erythrocyten auszuschliefsen, ermittelte ich (in Vers. IX, X, XI) gleichzeitig das Körperchenvolum vor und nach der Kohlensäureeinleitung mittels der Bleibtreuschen Methode.

Dabei verdünnte ich die Suspension mit Cl-freier isosmotischer Rohrzuckerlösung und stellte sowohl in der ursprünglichen Chlornatriumlösung als im Chlornatrium-Rohrzuckergemisch den Chlorgehalt fest (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Versuchszahl	Körperchenvolum vor CO_2-Einleitung	Körperchenvolum nach CO_2-Einleitung
X	55,4 Proz.	57,3 Proz.
XI	40,0 „	43,0 „
IX	31,9 „	41,1 „

Die in allen drei Versuchen hervortretende immerhin merkliche Vermehrung des Volums der Erythrocytensubstanz läfst sich eher (im Sinne v. Limbecks) für eine Quellung der Körperchen verwerten. Dies spricht aber entschieden auch für eine Fortwanderung des Chlors aus dem Serum.

Zur weiteren Aufklärung des chemischen Vorganges dieser Chlorverschiebung mufsten dann die wichtigen Angaben Gürbers*), dafs beim Durchleiten von Kohlensäure durch Blut sowohl das Serum als auch die Erythrocyten je ihren ursprünglichen K- und Na-Gehalt behaupten, nachgeprüft werden.

Zur Entscheidung hierüber ermittelte ich zunächst die Molekularkonzentration und den Aschengehalt der Aufsenflüssigkeit in beiden Vergleichsproben. Die Gefrierpunktsbestimmungen wurden in Berücksichtigung der Thatsache, dafs mit Kohlensäure gesättigtes Blut bei längerer Fortsetzung und Wiederholung der Bestimmung infolge des Kontaktes mit Luftsauerstoff beim Rühren den Gefrierpunkt ändert, in einer vorher mit Kohlensäure gefüllten Tube ausgeführt. Die Versuchsergebnisse sind enthalten in Tab. V (Molekularkonzentration der [künstlichen] Sera) und in Tab. VI (Aschengehalte).

Tabelle V.

Versuchszahl	Gefrierdepression	
	vor der Kohlensäureeinleitung	nach der Kohlensäureeinleitung
VIII	0,540	0,540
X	0,585	0,585

Tabelle VI (Vers. VIII).

	vor der Kohlensäureeinleitung	nach der Kohlensäureeinleitung
Chlor (ausgedrückt in Proz. NaCl)	0,775	0,670
Asche (in Proz.)	0,307	0,309

*) Sitzungsberichte d. med.-physikal. Gesellsch. Würzburg, 25. Febr., 1895.

Trotzdem also Chlor nachweislich aus dem (künstlichen) Serum verschwindet, bleibt sowohl die Molekularkonzentration als die Aschenmenge unverändert. Die Annahme, dafs das Chlor als Salz in die Erythrocyten einwandert, wäre danach höchstens unter der Voraussetzung möglich, dafs z. B. das Natrium des Serums sich entsprechend gegen Blutkörperchenalkali umtauscht.

Zur Ausschliefsung auch dieser letzteren Möglichkeit stellte ich noch folgenden Versuch (Vers. XI) an: Ich wusch Schweineerythrocyten, die nach v. Bunge frei von Natron sind, mit isosmotischer Kochsalzlösung und behandelte darauf eine Aufschwemmung derselben in letzterer mit Kohlensäure. Die Ergebnisse der an der Kohlensäure- und an der Kontrollprobe ausgeführten Kali-, Chlor- und Aschenbestimmung stellt Tabelle VII zusammen.

Tabelle VII (Vers. XI).

	vor CO_2	nach CO_2
Prozent Cl	0,952	0,867
Prozent KCl	—	0,0215 Proz. ClK
Gefrierpunkt	0,58	0,58

Die mit Kohlensäure beschickte Probe enthielt allerdings nachweisliche, auch spektroskopisch identifizierbare Mengen von Kalium, welche jedoch viel zu klein sind, als dafs ihr Austausch gegen das Natrium der Aufsenflüssigkeit die Abnahme des Chlors in der letzteren ausreichend zu erklären vermöchte. Gegenüber der älteren Auffassung, nach welcher Säuren nur als Salze in die Blutkörperchen einwandern, ist die Nichtbeteiligung der Alkalimetalle an dieser Bewegung unter den dargelegten Verhältnissen Thatsache. Auch noch in einer zweiten Beziehung ist Gürber zuzustimmen. Da bei Beschickung des Blutes mit Kohlensäure und nachträglicher Scheidung der Proben in Cruor und Serum das letztere mehr von dem Gase enthält, während die Körperchen für sich mehr Kohlensäure binden als Serum, wenn man beide Blutbestandteile getrennt mit dem Gase behandelt, hatte man auf eine Überwanderung von Kohlensäureträgern (bezw. von Alkali) aus den Erythrocyten nach dem Serum bei Zuleitung von Kohlensäure zum Blute, und zwar in dem Mafse geschlossen, als in der Blutflüssigkeit der Kohlensäuregehalt wächst. Das mitgeteilte Versuchsergebnis schliefst aber den Übergang von Kaliumkarbonat aus den Körperchen nach dem Serum aus, und die von Zuntz, Hamburger und anderen beobachtete Steigerung der Alkaleszenz des letzteren nach Einleitung von Kohlensäure ins Blut ist kaum anders

als durch die einschlägigen Annahmen Gürbers zu erklären. Bei Behandlung des Blutkörperchen-Kochsalzgemisches mit Kohlensäure wird nämlich durch diese aus der Verbindung mit Chlornatrium Salzsäure verdrängt und die freie Säure von den Blutkörperchen aufgenommen; in der Aufsenflüssigkeit bleibt Natriumkarbonat zurück, daher die alkalische Reaktion derselben.

Diese ungezwungenste Erklärung beruht auf dem Gesetze der Massenwirkung. Da die treibende Ursache für die Zerlegung eines Salzes durch eine Säure nicht auf „Anziehung" der zerlegenden Säure zum Metall des Salzes, sondern auf Übergehen der Ionen der Säure des zerlegten Salzes in den nicht dissoziierten Zustand beruht, so wird auch in unserem Fall das Anion des Chlornatriums mit dem H′-Ion der zerlegenden Säure, also das Chlor als HCl wandern. Es handelt sich hier also weder um eine Auswechselung von Salzen, noch um einen Ionenaustausch. Nun trifft in der Erythrocyten-Kochsalzsuspension eine schwache Säure auf das Salz einer starken Säure, und Erscheinungen, wie die soeben geschilderten, pflegen blofs einzutreten, wenn man umgekehrt dem Salz einer schwachen Säure eine starke Säure zufügt. Nach der Meinung von Kraus kommen aber in der chemischen Analyse beim Zusammentreffen zweier Elektrolyte mit einem gemeinsamen Ion ähnliche Verhältnisse auch sonst öfter in Frage. Speziell liefse sich hier das auch von Ostwald zitierte Beispiel der Fällung des Zinks mit Schwefelwasserstoff anführen. Bekanntlich pflegt man in solchen Fällen zu der Lösung Natriumacetat im Überschufs zuzusetzen. „Dies hat nicht nur die Wirkung, dafs an Stelle der stark dissoziierten Salzsäure die schwach dissoziierte Essigsäure tritt, sondern noch die weitere Wirkung, dafs bei überschüssigem Acetat auch die Dissoziation der Essigsäure selbst noch in sehr erheblichem Mafse herabgedrückt wird. Ein solcher Zusatz hat also den Erfolg, dafs man eine Flüssigkeit erhält, die fast wie eine neutrale sich verhält, während sie doch sauer reagiert, und diesen annähernd neutralen Zustand auch nicht verliert, wenn im angeführten Falle der Zersetzung eines Zinksalzes durch Schwefelwasserstoff fortwährend starke Säure durch die Reaktion in Freiheit gesetzt wird. Denn diese Säure erleidet stets sofort die geschilderten Umwandlungen, und die Konzentration der vorhandenen wenigen Wasserstoffionen wird nur um unverhältnismäfsig geringe Beträge vermehrt." In der Chlornatrium-Blutkörperchenmischung spielen nun sehr wahrscheinlich (saure) Eiweifsstoffe der Erythrocyten, die jenen Teil des Alkalis binden, welchen man

im Sinne von Loewy und Zuntz*), Gürber, Hamburger und anderen das schwer diffundierbare nennt, eine ähnliche Rolle wie dort das Natriumacetat. Leitet man nämlich Kohlensäure einfach in heifse Chlornatriumlösung, wird Salzsäure kaum in Spuren freigemacht. In der Körperchensuspension wäre weiter der Reaktionsablauf noch durch Abgabe der Salzsäure an die Erythrocyten begünstigt. Diese Auffassung macht es auch verständlich, dafs in meinen Versuchen das natürliche Serum, welches vermöge seiner Alkalireserve für sich bedeutende Mengen Kohlensäure aufzunehmen vermag, sich anders verhält, wie ursprünglich neutrales künstliches (isosmotische Chlornatriumlösung). Die von Gürber an ähnliche Versuchsergebnisse, wie die mitgeteilten, geknüpfte Vorstellung der „Impermeabilität" der Erythrocyten für K' und Na' erhält durch dieselben noch keine zwingende Beweiskraft. Das Metall des zerlegten Chlornatriums kann ja in der Aufsenflüssigkeit einfach durch Kohlensäure zurückgehalten sein.

Es bot weiterhin Interesse, zu prüfen, ob diese Chlorwanderung bereits nach geringen Zunahmen des Kohlensäuregehaltes des Serums auftritt, oder ob sie erst in Anspruch genommen wird, wenn die native Alkaleszenz des Serums mit Kohlensäure gesättigt ist.

Zu einer vorläufigen Orientierung hierüber wurde der Versuch gemacht, die Kohlensäuremenge durch verschieden langes Einleiten derselben zu variieren. Es sollte ermittelt werden, ob kleine Mengen überhaupt von Einflufs auf die Chlorverteilung im Blute sind. In Vers. XIII wurde tadellos defibriniertes Pferdeblut in vier Proben zu 150 ccm geteilt und die verschiedenen Proben verschieden lange mit einem ganz trägen Gasstrom behandelt. Tabelle VIII stellt die Ergebnisse zusammen.

Tabelle VIII.

Probe	Beschickung	Chlorgehalt des Serums
I	—	0,580 Proz.
II	100 Blasen (2 Minuten)	0,590 „
III	200 Blasen (4 „)	0,580 „
IV	400 Blasen (8 „)	0,575 „
V	1/2 Stunde	0,472 „

Man sieht, dafs die Beschickung mit 400 Gasblasen eine Änderung des Chlorgehaltes zur Folge hatte, welche man noch entschieden als innerhalb der Fehlergrenzen liegend bezeichnen mufs. Erst eine länger

*) Pflügers Archiv 58, 511.

dauernde Durchleitung erniedrigte den Chlorgehalt wesentlich. Um eine etwaige Kompensierung der Chlorverminderung durch gleichzeitige Verringerung des Serumvolums auszuschliefsen, bezw. um die absolute Chlormenge ermitteln zu können, und um die Quantität der in Wirksamkeit getretenen Kohlensäure zu bestimmen, stellte ich noch nachstehenden Versuch (Vers. XIV) an. Es wurde tadellos defibriniertes Pferdeblut in drei Proben geteilt. In Probe A wurden je 100 ccm Blut mit 50 ccm genau isosmotisch gemachter Chlornatriumlösung versetzt, gemischt, abzentrifugiert und die über den Körperchen stehende Serumverdünnung auf Chlor und Stickstoff untersucht. In Probe B wurden 100 ccm Blut 25 ccm isosmotischer Chlornatriumlösung und 25 ccm derselben Kochsalzlösung, welch letztere jedoch vorher eine halbe Stunde lang mit Kohlensäure beschickt worden war, hinzugefügt. In Probe C endlich setzte ich auf 100 ccm Blut 50 ccm der mit Kohlensäure behandelten isosmotischen Chlornatriumlösung zu. In allen drei Proben wurde nun aus dem Stickstoffgehalt der Serumverdünnung mit Berücksichtigung des vorher ermittelten Stickstoffgehaltes des negativen Serums das absolute Serumvolum nach Bleibtreu ermittelt und aus dem Chlorgehalt und dem Serumvolum die im Serumgemisch vorhandenen Chlormenge berechnet. Die Analysenresultate sind in Tabelle IX zusammengefafst.

Tabelle IX.

	Probe A 100 Blut + 50 ccm CO_2-freier NaCl-Lösung	Probe B 100 Blut + 25 ccm CO_2-gesättigter und 25 ccm CO_2-freier NaCl-Lösung	Probe C 100 Blut + 50 ccm CO_2-gesättigter NaCl-Lösung
Absolutes Serumvolum .	100,7	100,0	97,6
Chlorgehalt in Prozenten	0,7635	0,738	0,723
Absolute Chlormenge . .	0,7685	0,738	0,7056
Chlorabnahme	—	0,030	0,0578
Der CO_2-Zunahme würde äquivalent sein eine Chlorabnahme von . .	—	0,0615	0,123

Natives Serum.

$$5\text{ ccm} = \begin{cases} 0{,}0553\text{ g N} \\ 0{,}0556\text{ g N} \end{cases}$$

Probe A.

α) 10 ccm = 0,0557 g N

somit 0,557 Proz. N

$$\beta)\ 10\text{ ccm} = \begin{cases} 0{,}0760\text{ g NaCl} \\ 0{,}0767\text{ g NaCl} \end{cases}$$

somit 0,763 Proz. NaCl

$$\text{Serumvolum:} \begin{cases} \text{relativ} \ldots 50{,}7 \\ \text{absolut} \ldots 100{,}7 \end{cases}$$

Chlormenge entspr. 100,7: 0,7685.

Probe B.

α) 10 ccm = {0,0562 g N / 0.0559 g N}

somit 0,561 Proz. N

β) 10 ccm = 0.0738 g NaCl

also 0,738 Proz. NaCl

Serumvolum: {relativ . . . 50 / absolut . . . 100}

Chlormenge: 0,738.

Probe C.

α) 10 ccm = 0,0574 g N

also 0,574 Proz. N

β) 10 ccm = {0,0721 g NaCl / 0,0725 g NaCl}

somit 0,723 Proz. NaCl

Serumvolum: {relativ . . . 47,6 Proz. / absolut . . . 97,6 „}

Chlormenge 0,7056 g NaCl.

Kohlensäurebestimmung in der Chlornatriumlösung (nach der Methode Pettenkofers unter Benutzung von Barytlösung, Oxalsäure und Phenolphtalein): 15 ccm = {7,2 / 6,9} ccm $\frac{n}{10}$-Oxalsäure.

Aus den vorstehenden Zahlen ergiebt sich unzweifelhaft, dafs bereits Kohlensäuremengen, welche unter der nativen Alkaleszenz des Serums liegen (man vergl. besonders Probe B), eine nachweisbare Verminderung des Chlorgehaltes im Serum zur Folge haben, und dafs diese Verminderung der Menge der zugesetzten Kohlensäure annähernd proportional ist. Bezüglich der genaueren Relation zwischen der Gröfse der zugesetzten Kohlensäuremenge und derjenigen der Chlorabnahme aber wird man aus diesem Versuche wohl nur schliefsen können, dafs die Chlorabnahme wesentlich kleiner ist, als der äquivalenten Menge HCl entspricht. In beiden Proben beträgt die verdrängte Menge Chlorwasserstoff ungefähr blofs die Hälfte der acidimetrisch der Kohlensäure entsprechenden Quantität. Angesichts der Breite der Fehlergrenzen bei einer auf Bestimmungen verschiedener Art (Stickstoff, Chlor, Kohlensäure) basierten Relation wird man jedoch kaum weiter gehen können, als anzunehmen, dafs die Kohlensäure nur einen Teil der ihr äquivalenten Salzsäure aus dem Serum verdrängt.

Durch die letztangeführten Beobachtungen wird wenigstens die Möglichkeit nahegerückt, dafs der so viel diskutierte Einflufs der Kohlensäure auch für das Leben eine gewisse Geltung besitzt. Um mir hierüber annähernd quantitative Aufschlüsse zu

verschaffen, wählte ich den Grenzfall der physiologischen Kohlensäurebeschickung des Blutes, die Erstickung.

Einem kräftigen 20 kg schweren Hund wurde (Versuch XV) aus einer Schenkelarterie eine Blutprobe entnommen. Hierauf legte ich die Trachea des Tieres frei und zog dieselbe durch eine um sie herumgeführte Schnur zusammen. Beim Eintritt der Erstickungskrämpfe wurde abermals eine Blutprobe aus der Schenkelarterie entnommen, und als der Hund, nachdem die Krämpfe bereits sehr heftig gewesen waren, dem Tode ganz nahe war, zum dritten Male eine gröfsere Quantität. Die Untersuchung des Chlorgehaltes des Serums dieses Tieres ergab beim ursprünglichen Blut 0,677 Proz., in der zweiten Probe 0,640 Proz. und im Erstickungsblut 0,633 Proz.

Die vitale Schwankung des Chlorgehaltes des Serums innerhalb des lebenden Organismus beträgt hier somit in einem Maximalfalle weniger als 10 Proz. des Ausgangswertes, bleibt somit weit hinter den in vitro erzeugbaren zurück. Immerhin gestattet vielleicht dieses Eindringen gewisser Säureradikale unter dem Einflufs von Kohlensäure, den Blutzellen eine spezielle Funktion im Stoffwechsel zuzuweisen. Die im Plasma suspendierten Erythrocyten könnten nach den mitgeteilten Beobachtungen das Vermögen besitzen, an Alkali gebundene saure Stoffwechselprodukte durch Kohlensäure, welche dem Plasma in den Kapillaren zugleich mit jenen reichlich zuströmt, abzuspalten, in ihrem Leibe durch das Venensystem zu transportieren, und, Katalysatoren vergleichbar, die Entsäuerung der Gewebe beschleunigen. Die Umkehrbarkeit des Prozesses vorausgesetzt, welche nach Hamburgers Angaben eine gewisse Wahrscheinlichkeit besitzt, könnten dann diese Säuren nach Ausscheidung der Kohlensäure durch die Lungen ins Plasma zurückkehren und von hier an bestimmte Organe abgegeben, aus der Ökonomie entfernt werden u. s. w. Von vornherein ist es klar, dafs es für eine solche Funktion der Erythrocyten vorteilhaft wäre, wenn die durch anderweitige (stärkere) Säuren im Blute herbeigeführten Erscheinungen mit denjenigen, welche wir seitens der Kohlensäure kennen, keine volle Übereinstimmung darbieten, wenn die Kohlensäure in dieser Beziehung etwas Eigenartiges besitzen würde. Mit Rücksicht auf solche Möglichkeiten schien es mir schliefslich von Bedeutung zu sein, das Verhalten der Chloride des Serums bei Zusatz anderer Säuren zum Blute zu studieren.

Sämtliche Versuche dieser Reihe wurden angestellt, indem gemessene Mengen Pferdeblut spontaner Sedimentierung überlassen und dann von oben her gemessene Mengen der betreffenden Säure zufliefsen

gelassen wurden, so dafs die einfliefsende Säure Gelegenheit fand, mit den Alkalien des Serums in Beziehung zu treten, ehe sie an die Blutkörperchen gelangte.

Zunächst schien es mir geboten, zu untersuchen, wie dem Blute zugesetzte Salzsäure den Chlorgehalt des Serums beeinflufst; um der Möglichkeit eines verschiedenen Verhaltens kleiner und gröfserer Mengen Rechnung zu tragen, wurde der Versuch an demselben Blute mit verschiedenen Mengen zugesetzter Säure durchgeführt. Zu diesem Zwecke wurden (Vers. XVI) zu defibriniertem Pferdeblut in zwei Portionen wechselnde Mengen Salzsäure hinzugefügt. In Portion B wurden 5 ccm, in Portion C 10 ccm einer $^1/_4$-normalen HCl-Lösung auf 100 ccm Blut in der oben beschriebenen Anordnung zugesetzt. Der Chorgehalt der Salzsäure wurde zu 0,718 Proz. ermittelt. Beim nativen Blut wurde das relative Serumvolum nach Bleibtreu bestimmt, bei den beiden anderen Proben wurde das absolute Serumvolum aus dem N-Gehalt des Serums berechnet. Die beiden Proben blieben vollständig frei von Hämoglobinaustritt. Die Ergebnisse des Versuchs sind in nachstehender Tabelle wiedergegeben.

Tabelle X.

	Zusätze zu 100 Blut		Gehalt						
	Wasser ccm	HCl (ausgedrückt in Gramm NaCl)	N-Prozent des Serums Proz.	N-Proz.-Gehalt der Verdünnung 100:50 nach Bleibtreu Proz.	Absolutes Serumvolum	Prozentgehalt des Serums an Chlor	Absolute Chlormenge entspr. 100 Blut	Chlorzunahme entspr. dem Serum von 100 Blut	Diese Chlorzunahme in Proz. der gesamten zugesetzten Chlormenge (Stab II) Proz.
Natives Serum	—	—	0,630	0,326	53	0,603	0,318	—	—
Probe B	2,5	0,0359	0,616	—	54	0,6125	0,3307	+ 0,012	33
Probe C	5	0,0718	0,598	—	55	0,625	0,3437	+ 0,025	34

Berücksichtigt man zunächst (Stab 5 der Tabelle) das absolute Serumvolum, so findet sich bei Probe B und C eine Zunahme von 1 resp. 2 Proz., welche nicht der zugesetzten Wassermenge (2,5 resp. 5 Proz.) entspricht; es ergiebt sich daraus somit eine Zunahme des absoluten Körperchenvolums unter dem Einflufs des Säurezusatzes.

Betrachtet man weiterhin die Chlorwerte (Stab 6), so fällt auch ohne Beziehung derselben auf das absolute Serumvolum auf, dafs die Chlorzunahme bei B und C nicht mit dem Chlorzusatz zum Gesamtblut (Stab 2) im Verhältnis steht. Während letzteres

eine Zunahme von 0,0359 Proz. resp. 0,0718 Proz. erfährt, ändert sich der Prozentgehalt im Serum nur um 0,010, resp. 0,022 Proz. Noch deutlicher erkennt man, dafs der gröfsere Anteil des zugesetzten Chlorwasserstoffs in die Körperchen aufgenommen wurde, wenn man die aus der Multiplikation des Chlorgehalts mit dem absoluten Serumvolum sich ergebenden absoluten Chlormengen (entsprechend 100 g Ausgangsblut), welche in Stab 7 zusammengestellt sind, vergleicht. Die Differenz zwischen B, resp. zwischen C einer- und A andererseits, die Chlorzunahme des Serums (Stab 8), beträgt in beiden Fällen nur etwa ein Drittel des Gesamtzusatzes (Stab 2). Trotz der Variation der (in beiden Fällen unter der nativen Alkaleszenz des Serums liegenden) Säuremenge verhielten sich dabei die Proben B und C hinsichtlich der Aufteilung der Säure zwischen Erythrocyten und Serum völlig gleich.

Um noch eine weitere anorganische Säure heranzuziehen, setzte ich zu defibriniertem Pferdeblut, wiederum in der schon bekannten Anordnung, Schwefelsäure hinzu, und zwar zu 100 Blut 5 ccm $\frac{n}{4}$-Schwefelsäure. Vom nativen Blut war eine Bestimmung des (relativen) Serumvolums nach Bleibtreu gemacht worden. In der Schwefelsäureprobe war dies nicht gut möglich, weil das Serum merklich lackfarben wurde. Die Resultate (Versuch XVII) enthält Tabelle XI.

Tabelle XI.

	Natives Blut	Zusatz von 5 ccm $^1/_4$ H_2SO_4-Säure zu 100 ccm Blut
Relativ. Serumvolum (Bleibtreu)	55 Proz.	?
Relativer Chlorgehalt in Prozenten	0,575 „	0,530

Die Beurteilung des Ergebnisses wird durch das Fehlen der Werte für das Serumvolum bei der Schwefelsäureprobe einigermafsen erschwert. Immerhin zeigt aber der Vergleich der beiden prozentischen Chlorwerte eine so geringe Chlorabnahme in der Schwefelsäureprobe, dafs dieselbe nur auf Rechnung der Verdünnung durch die 5 ccm Zusatzflüssigkeit gesetzt werden kann. Würde man sich nämlich das Körperchenvolum als gleichbleibend denken, so müfste die Verdünnung des Serums allein eine Abnahme des prozentischen Chlorgehalts auf 0,522 bewirken. Die gefundene Abnahme auf 0,530 läfst also selbst bei Berücksichtigung der Möglichkeit einer Vermehrung des Körperchenvolums eine Chlorwanderung aus dem Serum in die Körperchen als recht unwahrscheinlich erscheinen. Die Schwefelsäure scheint sonach ebenfalls auf die Chlorverteilung keinen Einflufs auszuüben.

Als letzte Säure wurde endlich die Milchsäure, als Vertreterin der aliphatischen Oxysäuren herangezogen; ihre Verwendung lag um so näher, als die Kohlensäure selbst dieser Gruppe angehört, und sie bot auch mit Rücksicht auf Fragen des intermediären Stoffwechsels unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen ein gewisses Interesse. In Vers. XVIII wurden zu je 100 ccm tadellos defibrinierten Pferdeblutes in einer Probe (B) 5 ccm $\frac{n}{4}$-H_2SO_3-Lösung in einer anderen (C) $\frac{n}{4}$-Milchsäurelösung in der geschilderten Anordnung zugesetzt, und es wurde vom nativen Serum (A) sowie beiden Säureproben der Chlorgehalt des Serums ermittelt. Die zugesetzten Säuren waren in diesem wie im vorhergehenden Versuch auf ihre Chlorfreiheit geprüft worden. Vom nativen Blut war auch das relative Serumvolum nach Bleibtreu ermittelt worden; bei beiden anderen Proben konnte dies wiederum nicht durchgeführt werden, da das Blut durch die Säurebehandlung schwach, aber immerhin deutlich lackfarben wurde. Die Resultate dieses Versuches finden sich in Tabelle XII.

Tabelle XII.

	A (natives Serum)	B 100 Blut + 5 ccm $\frac{1}{4}$-n H_2SO_4-Säure	C 100 Blut + 5 ccm $\frac{1}{4}$-n Milchsäure
Serumvolum	—	—	—
Chloranalysen .	10 ccm = 0,0540 g NaCl = 0,0550 g NaCl	10 ccm = 0,0490 g NaCl = 0,0503 g NaCl	10 ccm = 0,0502 g NaCl = 0,0495 g NaCl
Prozentgehalt Chlor	0,545 Proz.	0,496 Proz.	0,497 Proz.

Für die Beurteilung dieser Ergebnisse mufs man dieselben Überlegungen wie bei Versuch XVII anstellen. Erwägt man die Verdünnung des Serums durch die zugesetzte Wassermenge, welche eine maximale Abnahme des prozentischen Chlorgehaltes bis zu 0,490 Proz. bewirken könnte, so wird man zugeben, dafs eine beobachtete Verminderung auf 0,496 zu gering ist, als dafs man daraus eine neben der Verdünnung wirksame Verdrängung des Chlors aus dem Serum annehmen müfste.

Von Wichtigkeit erscheint mir, festzustellen, dafs zwischen beiden zum Zusatze verwendeten Säuren (welche in äquivalenten Mengen zur Anwendung gelangten) kein Unterschied in der Wirkung besteht, dafs somit auch der Milchsäure, ebenso wie der Schwefelsäure, ein merklicher Einflufs auf die Chlorverteilung nicht zukommt.

Dafs der gröfsere Teil der zum Blut zugesetzten Salzsäure in die Körperchen aufgenommen wird, habe ich somit durch direkte chemische Analyse nachgewiesen. Dafs sich Schwefelsäure und Milchsäure sehr ähnlich verhalten, dafür spricht nach allem Früheren das von mir beobachtete Ausbleiben einer Chlorbewegung bei Beschickung des Blutes (bezw. des Serums) mit diesen Säuren. Denn wenn sich dieselben auf Erythrocyten und Blutflüssigkeit nach Mafsgabe ihrer Alkaleszenz aufteilen, fehlt für ein Fortwandern des Chlors aus dem Serum eine chemische Veranlassung. Da die Alkaleszenz der Körperchen nach allen darüber vorliegenden Angaben merklich gröfser ist als die des Serums, gehen vermutlich Salz-, Schwefel- und Milchsäure auch gröfstenteils in die Erythrocyten.

Nach der Auffassung von Hamburger würde sich gegenüber dem Blute die Kohlensäure völlig wie jede Säure schlechthin verhalten und in dieser Beziehung gar nichts Spezifisches zeigen. Nach den vorstehend mitgeteilten Versuchsergebnissen glaube ich aber doch einen wenigstens quantitativ weitgehenden (und für die früher postulierte Funktion der Erythrocyten zweckmäfsigen) Unterschied annehmen zu müssen. Wahrscheinlich werden auch noch ähnlich schwache, andere Säuren (Schwefelwasserstoff) das Blut so wie die Kohlensäure beeinflussen. Die „Permeabilität“ braucht hierbei nicht gerade eine besondere Rolle zu spielen, sehr schwache Säuren vermögen einfach die schwer diffusiblen Alkaliverbindungen der Zellen nicht rasch zu zerlegen.

Es war viel Grund gegeben, zu denken, dafs Alkalien und Säuren als leicht diffusible Stoffe überall in den Zellen und in der Säftemasse zusammentreffen und auch überall direkt aufeinander reagieren. Beobachtungen, wie die mitgeteilten, legen aber doch die Vermutung nahe, dafs auch bei der einfachen Reaktion der Bindung von Säure und Alkali im Organismus innig mit Zellen verknüpfte kolloide Substrate ausschlaggebend vermitteln können. Die Bewegung von Säuren und Alkalien im Körper würde dann durch im Protoplasma streng lokalisiert festwurzelnde Verbindungen, denen das geeignete Material von An- und Kationen zugeschwemmt wird, bestimmte Richtungen empfangen. Um hierüber sichere Aufschlüsse zu erlangen, mufsten natürlich aufser den Erythrocyten auch Zellen anderer Provenienz auf ihr einschlägiges Verhalten geprüft werden. Mit einer dahinzielenden Untersuchung bin ich beschäftigt.

Graz, Ende Juli 1902.

XII.

Zur Kenntnis der Autolyse des Fischfleisches.

Von Dr. **Sigval Schmidt-Nielsen.**

(Fischerei-Departement Bergen, Norwegen.)

Frisch geschlachtetes Säugetierfleisch hat bekanntlich eine zähe und trockene Beschaffenheit, weshalb es vor der Zubereitung einige Zeit aufbewahrt wird, damit die sogenannte Totenstarre sich löst und das Fleisch saftig und mürbe wird. Das Fleisch mufs eine „Reifung" durchmachen. Eine völlig ausreichende Erklärung, worin diese Erscheinung eigentlich besteht, ist bis jetzt nicht in der Litteratur zu finden.

Dafs diese postmortale Erscheinung einfach als eine durch Milchsäurebildung veranlafste Lösung der Eiweifskörper oder, wie ältere Forscher angenommen haben, als eine bakterielle Fäulniserscheinung aufzufassen ist, läfst sich wohl zur Zeit nicht mehr aufrecht halten.

Was Hoppe-Seyler für den Zellstoffwechsel vermutungsweise ausgesprochen hat, mufs man jetzt nach den Untersuchungen von Salkowski, Gautier, Schwiening, Hedin, Vogel und anderer für den Säugetiermuskel als gesicherte Thatsache ansehen, nämlich dafs die Zellen desselben im stande sind, sich ohne Beihülfe von Bakterien durch in ihnen auftretende Enzyme selbst in einem gewissen Grade zu verdauen.

Die Autodigestion der Skelettmuskeln der Säugetiere lag aufserhalb des Rahmens meiner Arbeit, aber ich möchte doch an dieser Stelle erwähnen, dafs ich in Bestätigung und Ergänzung bereits vorliegender Befunde durch am Hundefleisch angestellte Untersuchungen gefunden habe:

1. dafs die Autolyse des Fleisches weitaus langsamer unter antiseptischen als unter aseptischen Kautelen verläuft;

2. dafs die schwach wirkenden Enzyme desselben allmählich gewisse Eiweifskörper durch die Stufe der Albumosen und Peptone hindurch zu Aminosäuren hydrolysieren;
3. dafs eine erheblichere Xanthinbasenbildung, wie ich sie für einige Fische gefunden habe (siehe unten), hier nicht stattfindet;
4. dafs die Enzyme der Skelettmuskeln teilweise im stande sind, ihre Thätigkeit auch in kochsalzgesättigter Flüssigkeit zu entfalten.

Beim Fischfleisch hat man es „in praxi" nicht mit einer ähnlichen Totenstarre und Lösung derselben wie beim Säugetierfleisch zu thun.

Obwohl die Zubereitung frischer Fische für gewöhnlich „lebendes" Rohmaterial erfordert, so wäre es doch nicht erlaubt, daraus zu schliefsen, dafs man bei den Fischen keine Reifungsvorgänge kennt.

Im Gegenteil, viele Fische, besonders die gesalzenen, müssen vor dem Genufs einen intensiven Reifungsvorgang durchmachen. Es würde an dieser Stelle zu weit führen, auf die praktische und fischereitechnische Seite dieser Frage näher einzugehen; ich habe darüber schon an anderem Orte berichtet*).

Im nachstehenden sollen nur jene Momente behandelt werden, welche ein biologisches Interesse darbieten.

Unter den durch Einsalzen konservierten Fischprodukten sind die Pökelheringe die wichtigsten und am meisten gekannten.

In einer Reihe rein chemischer, mikrobiologischer und physiologisch-chemischer Untersuchungen habe ich in den letzten Jahren den Reifungsvorgang beim Pökeln von Heringen genauer studiert und dabei gefunden, dafs die Fischmuskeln ebenso wie die Säugetiermuskeln Agentien (Enzyme) enthalten, welche nach dem Tode, und zwar selbst in kochsalzgesättigter Flüssigkeit, eine Reihe von chemischen Veränderungen, vorwiegend Spaltungen, bewirken, welche zusammen den Reifungsvorgang darstellen.

Bei den Fischen besteht ein grofser Unterschied zwischen fetten und mageren Arten; bei beiden haben wir es mit einer

*) Sigval Schmidt-Nielsen: Über den Reifungsvorgang beim Pökeln von Heringen. Det kgl. norske videnskabers selskabs skrifter 1901, Nr. 5, Throndhjem 1902. — Chemical and microbiological Investigations on the Curing of Herring. Report on norwegian Fishery and marine Investigations. Vol. I, 1900, Nr. 8, S. 99 u. f. Bde.



Autodigestion zu thun, doch kann man bei den letzteren kaum von einem Reifungsvorgang sprechen.

Wie das Rohmaterial sind die gebildeten Produkte verschieden, und sie werden deswegen auch hier getrennt besprochen.

1. Die Autolyse der Heringe.

Gleich nach dem Fange werden die Heringe ausgenommen, mit ungefähr $^1/_3$ bis $^1/_4$ ihres Gewichtes an Kochsalz in Tonnen gepackt und sich selbst überlassen.

In 8 bis 14 Tagen haben sie dann jene Prozesse durchgemacht, durch welche sie geniefsbar werden.

Die Entscheidung darüber, wann dieser Reifungsvorgang abgeschlossen ist, ist fast ausschliefslich Geschmackssache. Man findet eben, dafs die Heringe ihren „rohen“ Geschmack verloren haben. Als objektives Kennzeichen gilt, dafs die Haut sich leicht abziehen, und das Fleisch sich leicht von den Rückengräten abtrennen läfst.

Vom analytisch-chemischen Gesichtspunkte aus sind die Pökelheringe im Vergleiche mit dem frischen Material durch einen niedrigen Wassergehalt, einen entsprechend höheren Stickstoff-, Fett- und Salzgehalt charakterisiert.

Dies ist einfach durch die gewaltigen osmotischen Prozesse veranlafst, die sich einstellen, wenn das salzarme Heringsfleisch in dauernde Berührung mit festem Kochsalz bezw. einer gesättigten Kochsalzlösung kommt.

Die eigentümliche Geschmacks- und Konsistenzänderung, die diesen physikalischen Veränderungen parallel geht, kann nicht auf einfache Salzwirkung zurückgeführt werden. Sie mufs in einer chemischen Veränderung begründet sein. Um diese genauer festzustellen, habe ich einerseits die Heringslake, in welche naturgemäfs neugebildete diffusible Produkte übertreten, andererseits das Heringsfleisch selbst untersucht.

Die Heringslake. So wie die Heringslake von den Tonnen abgezapft wird, bildet sie eine salzreiche, stark getrübte, mehr oder weniger dunkel gefärbte Flüssigkeit von neutraler Reaktion und charakteristischem Geruch.

Die Trübung der Lake rührt her von einem feinverteilten Sediment, das hauptsächlich aus gefälltem, zum Teil koaguliertem Muskeleiweifs besteht.

Ganz junge, nur wenige Tage alte Proben lassen sich nicht klar filtrieren, sondern behalten stets ein grau-trübes Aussehen.

Die ein wenig älteren Proben filtrieren weit leichter und vollständig klar.

Von den anorganischen Bestandteilen ist aufser Kochsalz eine recht erhebliche Phosphorsäuremenge, wahrscheinlich in organischer Bindung, zu erwähnen.

Es wurde z. B. gefunden:

In einer 14 Tage alten norwegischen Lake 1,6 ‰ P_2O_5.
„ „ 1 Monat „ „ „ 1,6 „ „
„ „ 2½ Jahre „ „ „ 1,9 „ „
„ „ 5 Jahre „ „ „ 2,1 „ „

Die Gesamtmenge der anorganischen Salze bewirkt, dafs die Lake fast gesättigt ist und ziemlich konstant ein spezifisches Gewicht von 1,21 zeigt.

In dieser kochsalzgesättigten Flüssigkeit vegotieren in der ersten Zeit, wo die Reifungsvorgänge sich eben vollziehen, zahlreiche Bakterien. Es ist jedoch, wie unten auseinandergesetzt werden soll, durchaus zweifelhaft, ob man ihnen beim Heringspökeln eine ähnliche wichtige Rolle wie etwa bei der Käsegärung beimessen kann.

Die auffallendste chemische Veränderung erfährt die Lake während des Reifungsvorganges durch den Übertritt von organischen, zunächst stickstoffhaltigen Stoffen in dieselbe.

Als Mafs für die Menge derselben liegt es nahe, den Gehalt der Lake an Stickstoff anzusehen. Durch Bestimmung des Gesamtstickstoffes in einer gröfseren Anzahl von Proben zeigte sich, dafs kleine Mengen von organischer Substanz sehr bald aus den Heringen heraustreten. Schon nach 24 Stunden hat die Lake einen Sticktoffwert von 1 ‰ erreicht. Die tägliche Stickstoffvermehrung in der Lake nimmt dann allmählich ab, bis sie nach ein paar Monaten praktisch abgeschlossen ist; der Stickstoffgehalt beträgt dann durchschnittlich 5 ‰; doch ist die Zunahme auch nach dieser Zeit vorhanden. So enthielt z. B.:

2½ Jahre alte norwegische Lake 9 ‰ N*)
5 „ „ „ „ 12 „ „

Selbst wenn man mit den höchsten Werten rechnet, die ich in den verschiedensten Proben gefunden habe, so zeigt sich, dafs vom Lakestickstoff nur ein geringer Teil in Form von geronnenem Eiweifs vorhanden ist, während der Rest unter den Sammelnamen „Nichteiweifs“ oder „Amidstickstoff“ fällt.

*) Alle Analysen beziehen sich hier wie später auf die klar filtrierte Lake und geben nur den gelösten Stickstoff an.

Alter und Art der Probe		Gesamt-Stickstoff	Eiweifsstickstoff durch Koagulation	Eiweifsstickstoff durch Fällung mit Essigsäure	Eiweifsstickstoff nach Ritthausen
Lake von norw. Fettheringen	1 Monat	3,4 ‰	0,6 ‰	0,7 ‰	0,9 ‰
	1 „	3,7 „		0,9 „	1,2 „
	1 Jahr	5,3 „			1,8 „
	5 Jahre	12,0 „	0,5 „	0,9 „	1,6 „
Holländische Lake		4,6 „	1,0 „		

Die qualitative Untersuchung lehrt, dafs das koagulable Eiweifs aus Globulinen und Albuminen besteht; daneben finden sich Albumosen und Myoproteide (nicht koagulable aus der salzhaltigen Lösung durch Essigsäure fällbare Eiweifskörper).

Was das „Nichteiweifs" betrifft, so konnte in der Lake die Gegenwart von Xanthin und Fleischbasen, Aminen, Amiden, Mono- und Diaminosäuren, Aminosäureamiden zu erwarten sein. Um über die Menge dieser Stoffe, bezw. über die Bindungsweise des Stickstoffes in denselben eine vorläufige Vorstellung zu gewinnen, habe ich in der Lake neben dem Gesamtstickstoff den durch salpetrige Säure*), den durch Bromlauge abspaltbaren und überdies den in Purinbasen enthaltenen Stickstoff bestimmt.

Alter und Art der Probe		Gesamt-Stickstoff	Stickstoff abspaltbar durch HNO_2	Stickstoff abspaltbar durch NaBrO	Xanthin-N
Norwegische Laken	1 Monat	3,7 ‰	0,7 ‰	0,7 ‰	0,6 ‰
	1 Jahr	5,3 „	1,2 „		
	2½ Jahre	8,8 „	3,7 „		
	5 „	12,0 „	5,7 „	1,6 ‰	1,3 ‰

Man kann aus diesen Daten entnehmen, dafs in der Lake Amide und Aminosäuren in ziemlich reichlichen Mengen vertreten sein müssen, zumal ich durch Destillation mit Magnesia mich davon überzeugt habe, dafs die Lake arm an Ammoniakstickstoff ist. So enthielt z. B. eine Lake mit 3,7 Promille Gesamtstickstoff 0,1 Promille und eine andere mit 4,6 Promille Gesamtstickstoff 0,16 Promille präformierten Ammoniakstickstoff.

Davon, dafs wirklich Aminosäuren in der Lake reichlich vorhanden sind, kann man sich übrigens auch durch qualitativen Nach-

*) In der nach Ritthausen enteiweifsten Flüssigkeit.

weis derselben überzeugen. Kocht man die enteiweifste Lake mit Kupferkarbonat, so erhält man eine tiefblau gefärbte Flüssigkeit, deren Farbe sich beim Kochen und Eindampfen nicht verändert.

Was die Menge der Aminosäuren betrifft, so lehrt die Tabelle, dafs sie nicht allein absolut, sondern auch im Verhältnis zum Gesamtstickstoff mit dem Alter der Laken zunimmt.

Summiert man den Eiweifs-, den durch salpetrige Säure abspaltbaren und den Xanthinbasenstickstoff, so erhält man jedoch nicht den Wert des Gesamtstickstoffes, trotzdem diese Zahlen teilweise denselben Stickstoffverbindungen angehören und daher bei dieser Berechnungsweise doppelt gezählt werden.

Ich habe daher versucht, den Lakestickstoff in Gesamtstickstoff, Eiweifsstickstoff, freien und leicht abspaltbaren Ammoniakstickstoff, Basenstickstoff, Monaminostickstoff und in Xanthinstickstoff aufzuteilen, und gebe nachstehend die gefundenen Werte in tabellarischer Zusammenstellung. Zum Vergleich lasse ich die an kochsalzgesättigtem Extrakt aus frischen Heringen ermittelten Zahlen vorangehen.

Extrakt aus frischen Heringen enthielt:

Gesamtstickstoff	3,15	‰	N.
Durch Tannin fällbare Verbindungen	1,40	„	„
Direkt durch Magnesia abdestilliert	0,35	„	„
Nach Zerkochen mit Salzsäure durch Magnesia abdestilliert	0,40	„	„
Phosphorwolframsäure direkt fällt	2,11	„	„
Nach Zerkochen mit Salzsäure und Dest. mit Magnesia fällt Phosphorwolframsäure	0,88	„	„
Xanthinbasen	0,00	„	„
oder anders ausgedrückt:			
Gesamtstickstoff	3,15	„	„
Nicht koagulables Eiweifs (Myoproteide und andere tanninfällbare Stoffe.)	0,40	„	„
Präformiertes Ammoniak	0,35	„	„
Durch Säure leicht abspaltbarer Stickstoff	0,05	„	„
Basenstickstoff	0,88	„	„
Monaminostickstoff (Maximum!)	1,04	„	„
Xanthinbasen	0,00	„	„

Eine norwegische Heringslake enthielt:

Direkt	4,6	‰	N.
Nach Koagulation	3,6	„	„
Direkt durch Tannin fällbar	1,0	„	„
Durch Tannin nach Koagulation fällbar	0,2	„	„
Direkt durch Magnesia abdestillierbar	0,16	„	„

Nach Zerkochen der koagulierten Lake mit Salzsäure, abspaltbar durch Magnesia	0,27	‰	N.
Nach Koagulation mit Phosphorwolframsäure fällbarer Stickstoff	1,34	„	„
Xanthinkörper	0,17	„	„
oder anders ausgedrückt:			
Gesamtstickstoff	4,6	„	„
Koagulables Eiweifs	1,00	„	„
Nicht koagulables Eiweifs (Myoproteide, Albumosen und andere tanninfällbare Stoffe.)	0,2	„	„
Präformiertes Ammoniak	0,16	„	„
Durch Säure leicht abspaltbarer Stickstoff	0,11	„	„
Basenstickstoff	1,34	„	„
Monaminostickstoff	2,26	„	„
Xanthinbasen	0,17	„	„

Vergleicht man diese Tabellen, so fällt auf, dafs die frischen Heringe gar keine oder nur Spuren von Xanthinbasen enthalten, während solche in den gepökelten in reichlicher Menge vorhanden sind. Das frische Heringsfleisch scheint ferner reicher an mit Magnesia austreibbarem Stickstoff zu sein, während die Menge von durch Säure leicht abspaltbarem Ammoniak in der Lake gröfser ist.

Dafs das frische Fleisch mehr Ammoniak bezw. locker gebundenen Stickstoff enthält, scheint zunächst auffallend, läfst sich aber wohl dadurch erklären, dafs ein Teil als Magnesiumammoniumphosphat ins Lakesediment übergeht. (Phosphorsäure sowohl wie Magnesia sind ja ausreichend vorhanden.) Monaminostickstoff ist in der Lake in gröfseren Mengen vorhanden, was von dem Basenstickstoff nicht mit Sicherheit gesagt werden kann.

Durch die qualitative Untersuchung läfst sich zeigen, dafs im frischen Heringsfleisch keine Aminosäuren vorhanden sind — sie werden erst beim Pökelprozefs gebildet. Indessen enthält bereits das frische Heringsfleisch nicht koagulable Verbindungen, die durch salpetrige Säure und Bromlauge gespalten werden, nach einer Einzelbestimmung entsprechend einem Minimalgehalt von 0,8 Promille N — eine Menge, die völlig ausreicht, um den Gehalt davon in der Lake zu erklären. Da aber die Lake Aminosäuren enthält, das frische Fleisch dagegen nicht, so mufs hier trotz der quantitativen Gleichheit doch ein qualitativer Unterschied bestehen.

Was die Myoproteide*) betrifft, so scheint der Gehalt daran

*) Neben dem zuerst von v. Fürth beschriebenen Myoproteid, das durch Kochsalz fällbar ist, und das ich vorläufig als Myoproteid A bezeichne, habe ich in der Lake zwei andere Myoproteide (B und C) gefunden. Diese werden



in der Lake geringer zu sein, aber es wäre verfrüht, daraus zu schliefsen, dafs diese leichter gespalten bezw. in Aminosäuren übergeführt werden als die koagulablen Eiweifskörper.

Die ersten hydrolytischen Spaltungsprodukte des genuinen Eiweifses, Albumosen und Peptone, sind in jungen Laken nur in geringen Mengen, aber nicht konstant vorhanden.

Nach etwa einem Jahre treten sie gleichzeitig mit einer Zunahme der schon in den ersten Wochen nachweisbaren Tryptophanreaktion in reichlicher Menge auf.

Aus den hier skizzierten Untersuchungen geht hervor, dafs beim Pökeln der Heringe eine Reihe von stickstoffhaltigen Körpern auftritt, die im frischen Heringsfleisch nicht vorhanden waren. Von diesen sind die Xanthinbasen und die Aminosäuren speziell hervorzuheben, obwohl man annehmen darf, dafs die anderen noch nicht charakterisierten Anteile ebenso viel Interesse darbieten.

In der Bildung dieser verschiedenen Produkte besteht, glaube ich, der Reifungsvorgang, soweit es sich um Veränderungen von stickstoffhaltigen Substanzen handelt. Er beruht danach auf fermentativen Vorgängen, die sich in der kochsalzgesättigten Lösung vollziehen*).

Das Heringsfleisch. Da die Veränderungen der stickstoffhaltigen Bestandteile des Heringsfleisches auch in der Zusammensetzung der Lake zum Ausdruck kommen, ist hier vor allem eine etwaige Umwandlung der Fette in Betracht zu ziehen.

Die Untersuchung der Fette wurde, um die Störung durch Lecithine und andere ätherlösliche Körper möglichst zu vermeiden, nach Ausschmelzen mit Wasser vorgenommen.

Die so gewonnenen Fette, die keine wasserlöslichen Säuren enthielten, wurden auf Säurezahl, Acetyl- und Jodzahl untersucht.

Es zeigte sich, dafs die Fette der Pökelheringe im Vergleich mit frischem Material eine mit der Dauer der Einpökelungszeit

---

erst bei 65 proz., bezw. bei Ganzsättigung mit Ammoniumsulfat gefällt. Beide lassen sich wahrscheinlich in zwei Modifikationen trennen, wovon die eine (α) in kochsalzarmer Flüssigkeit durch Essigsäure fällbar ist, die andere (β) erst in kochsalzreicher Flüssigkeit. Auf die Klassifikation und die Eigenschaften dieser Körper werde ich nächstens zurückkommen.

*) Die Annahme, dafs es sich, wie Dastre seinerzeit für die Fibrinolyse annahm, um eine digestive Wirkung des Kochsalzes handelt, darf wohl jetzt als unbegründet aufser Betracht bleiben, obwohl man auf der anderen Seite nicht a priori ausschliefsen kann, dafs die Salzspannung dabei in irgend einer Weise beteiligt ist.

stark steigende Säure- und Acetylzahl aufweisen, während zur selben Zeit die Jodzahl abnimmt.

Art der Heringe	Zeit nach dem Einpökeln	Das durch Kochen mit Wasser ausgeschmolzene Fett hat:		
		Säurezahl	Acetylzahl	Jodzahl
Norwegische	0	0,6	8,88	131,2
"	0	0,8		
Holländische	14—30 Tage	10,6		134
"	?	30,2	25,5	122
Norwegische	9 Monate	37,0	21,0	127,9

Die beobachtete auffällige chemische Veränderung der Fette kann wohl am besten als eine Umwandlung von ungesättigten Fettsäuren in Oxyfettsäuren aufgefafst werden und ist vermutlich ebenfalls auf Prozesse enzymatischer Natur zurückzuführen.

Nimmt man an, dafs die beim Reifen der Pökelheringe auftretenden chemischen Veränderungen fermentativer Natur sind, so erhebt sich naturgemäfs die Frage, ob sie von den Enzymen des Fischfleisches oder den im Anfange reichlich auftretenden Bakterien veranlafst werden. Man könnte auch denken, dafs sie das Resultat eines Zusammenwirkens der Enzyme beider Zellentypen darstellen, so zwar, dafs die Bakterien die von den Geweben selbst eingeleiteten Prozesse fördern oder hemmen.

Es ist einerseits bekannt, dafs die Mikroorganismen bei verschiedenen analogen Prozessen, insbesondere bei der Käsegärung, eine entscheidende Rolle spielen, auf der anderen Seite ist durch die Untersuchungen der letzten Jahre über die Autolyse von tierischen und pflanzlichen Geweben eine Reihe von Thatsachen bekannt geworden, welche zeigen, dafs manche Prozesse, die früher ausschliefslich auf Bakterienwirkung zurückgeführt wurden, in derselben oder in einer ähnlichen Weise auch ohne Beihülfe von Bakterien verlaufen, mit anderen Worten, dafs sie durch Agentien, die der lebenden Zelle selbst angehören oder in derselben nach dem Absterben auftreten, veranlafst sind.

Für den uns vorliegenden Fall ist nach dem oben Gesagten von den stattfindenden Spaltungen nachweislich die Xanthinbasenbildung weder direkt durch den Lebensprozefs der Bakterien noch durch Enzyme derselben veranlafst; Heringsfleisch, das frisch durch Kochen sterilisiert wurde (wodurch die Enzyme insgesamt unwirksam wurden), und das nachträglich durch die Bakterien des Herings-

darmes infiziert wurde und in Fäulnis überging, erwies sich als frei von Xanthinbasen.

Dagegen könnten die Aminosäuren ebenso gut von den Bakterien wie von den Muskelenzymen gebildet sein. Das gilt auch von den ersten hydrolytischen Spaltungsprodukten des Eiweifses, wie zuerst Salkowski nachgewiesen hat.

Durch eigene darauf gerichtete Untersuchungen habe ich mich wie oben erwähnt, davon überzeugen können, dafs auch die Fischmuskeln Enzyme besitzen, die das Eiweifs bis auf Aminosäuren spalten, und dafs sie diese ihre Thätigkeit auch in kochsalzgesättigter Flüssigkeit entfalten können. Es steht daher der Annahme nichts im Wege, dafs wir es bei dem Reifen der Pökelheringe hauptsächlich mit einer Autolyse zu thun haben. Die Spaltung der Glyceride kann im allgemeinen auch durch Mikroorganismen veranlafst sein. Aber da hier das Fett gleichmäfsig im Fleisch verteilt ist und das Heringsfleisch, wie Lambertz und Kulescha*) gezeigt haben und ich im wesentlichen bestätigen kann, steril gefunden wird, ist kaum eine andere Vorstellung möglich, als dafs auch die Fettspaltung einen autolytischen Vorgang darstellt.

Nach dem eben Gesagten können die Bakterien ihre Thätigkeit wesentlich nur in der Lake entfalten. Immerhin bleibt noch die Möglichkeit, dafs die in der Lake gebildeten Stoffwechselprodukte den Pökelheringen einen besonderen Geschmack verleihen. Ich habe, da die Methoden der jetzigen Bakterienphysiologie hier sehr wenig ausreichen, nicht nach typischen Bakterienstoffwechselprodukten gesucht. Insofern wäre diese Frage schwer zu beantworten. Indessen glaube ich, dafs sie indirekt ihre Beantwortung findet.

Einmal ist, wie schon erwähnt, der Reifungsvorgang auffällig vom Rohmaterial abhängig. Fettreiche Fische, wie Heringe, Lachse, Forellen, Makrelen und andere, reifen im gepökelten Zustande. Salzt man dagegen Dorsche, Schellfische und andere magere Fische ein, so fehlt der Reifungsprozefs.

Danach scheint es, dafs die Spaltung der Neutralfette beim Reifungsvorgang eine entscheidende Rolle spielt — und diese ist, wie erwähnt, sicher ein Prozefs autolytischer Natur. Auch eine andere auffällige Begleiterscheinung, nämlich die reichliche Xanthinbasenbildung, ist ausschliefslich ein autolytischer Vorgang.

*) Lambertz siehe Stadler: Über die Einwirkung von Kochsalz auf Bakterien u. s. w. Archiv für Hygiene 35. — Kulescha, G.: Untersuchungen über die Bakterienflora der Heringslake. (Bericht des landwirtsch. bakteriol. Laboratoriums des Ministeriums der Agrikultur. St. Petersburg 1899.)

Um die Frage endgültig zu entscheiden, habe ich Pökelversuche angestellt, wo die Bakterienwirkung durch Zusatz von Antisepticis, wie Fluornatrium und Natriumsalicylat, ausgeschlossen war. Man erhielt dabei, trotz des Fehlens von Bakterien, doch Pökelheringe, die von den Praktikern als „reif" bezeichnet wurden.

Dadurch ist gezeigt, dafs der **Reifungsvorgang der Pökelheringe ebenso wie jener des frischen Säugetierfleisches auf Autolyse beruht.**

Unter den oben erwähnten Befunden knüpft sich das gröfste theoretische Interesse

1. an die autolytische Bildung von Oxyfettsäuren aus ungesättigten Fettsäuren;
2. an die reichliche Abspaltung von Xanthinbasen. Diese ist um so beachtenswerter, als sie nach meinen bisherigen Untersuchungen nur bei den fetten Fischen durch Autolyse zu stande kommt und durch Bakterienwirkung gehemmt wird.

Auf die Verbreitung, das Substrat und die Ursache dieser eigentümlichen biochemischen Spaltung werde ich in einer zweiten Mitteilung näher eingehen.

XIII.

Die Globuline des Blutserums.

Von cand. med. **Otto Porges** aus Teplitz und **K. Spiro.**
(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Seit den ersten ausführlichen Arbeiten Hammarstens über die Globuline des Blutserums ist die Frage nach der Einheitlichkeit des „Serumglobulins" Gegenstand vielfacher Untersuchungen gewesen. Während Burckhardt glaubte, dafs das Serumglobulin kein einheitlicher Körper, und dafs durch Dialyse und Kohlensäureeinleitung oder Essigsäurezusatz die quantitative Abscheidung eines darin enthaltenen Körpers möglich sei, wies Hammarsten einwandsfrei nach, dafs das durch Dialyse nicht direkt fällbare Globulin in durch Dialyse fällbares umgewandelt werden kann. Ähnliche Anschauungen wie Burckhardt hat dann in neuerer Zeit Markus vertreten, der auch ein wasserlösliches Globulin von einem wasserunlöslichen zu scheiden suchte. In einer mit E. Fuld gemeinsam publizierten Arbeit wurde dann beiläufig über Versuche berichtet, die bereits im Winter 1897/98 angestellt waren und eine Zerlegung des Globulins mit Hülfe der Hofmeisterschen fraktionierten Aussalzung herbeizuführen suchten. Bei diesen Versuchen kamen gesättigte Lösungen von zwei Salzen in Anwendung, nämlich von Kaliumacetat und Ammonsulfat. Bei den Versuchen mit Kaliumacetat, welche zum Teil von Herrn cand. med. B. Haake ausgeführt wurden, ergab es sich, dafs durch Halbsättigung mit Kaliumacetat eine kleinere Quantität Globulin ausgefällt wurde als durch Ammonsulfat, so dafs es möglich schien, auf diesem Wege zu einer Fraktionierung zu kommen. Eingehendere Versuche über die Aussalzung mit Kaliumacetat hat dann Herr J. Wallerstein im hiesigen Institute ausgeführt und gezeigt, dafs mit zunehmender Verdünnung die Werte für das fällbare Globulin ein wenig abnehmen, dafs aber in demselben Serum trotz stark wechselnden

Wassergehalts stets ungefähr derselbe Bruchteil des Gesamtglobulins aussalzbar ist. Er fand, dafs im Pferdeserum 28,5 Proz. des Eiweifses durch Kaliumacetat fällbar waren, in dem des Schweines 44,5 Proz., in dem des Hundes 79 Proz., in dem des Kaninchens 52 bis 59 Proz., in dem des Menschen 38 Proz. Bei hungernden Kaninchen war eine Zunahme des Gesamtglobulins nachweisbar, die sich in den zwei angestellten Versuchen ungleich auf die beiden Komponenten verteilte. In der Lymphe eines Hundes waren 79,11 Proz. des Gesamteiweifses Globulin, davon 48,27 Proz. durch Kaliumacetat aussalzbar. Bei pleuritischen Exsudaten waren die entsprechenden Zahlen 35,9 bezw. 52,41, 50,4 bezw. 39,23, 44,18 bezw. 32,26. In nephritischem Harn waren sie einmal 79,37 bezw. 32,42, ein andermal 10,0 bezw. 0,79.

Unsere eigenen Versuche mit Kaliumacetat ergaben, dafs anscheinend keine von den Fraktionen, wie man sie durch Ammonsulfat aus dem Serum erhalten kann, mit der durch Halbsättigung mit Kaliumacetat darstellbaren zusammenfällt. Die durch Ammonsulfat darstellbare erste Fraktion („Euglobulin") wurde durch Halbsättigung mit Kaliumacetat nicht vollständig ausgesalzen, ihre obere Grenze lag vielmehr erst bei 90 Proz. Sättigung. Auch zeigte eine Pseudoglobulin-Fraktion, die durch Kaliumacetat nicht mehr aussalzbar war, nach mehrstündigem Stehen mit dem Salz eine Trübung, die durch Verdünnung nicht mehr aufgehellt werden konnte. Daraus mufste geschlossen werden, dafs entweder die Fraktionierung mit Kaliacetat eine andere Gruppierung der vorhandenen Globuline veranlafst, d. h. die Zahl der Globuline gröfser ist als zwei, oder dafs das Kaliacetat (vermöge seiner Alkalescenz) verändernd auf einen Teil derselben einwirkt. Wir glauben daher, dafs die Zahlen, wie man sie mit Kaliumacetataussalzung erhält, nicht mit den durch das Ammonsulfatverfahren gewonnenen, wohl aber untereinander vergleichbar sind.

Von den mit Ammonsulfat erhaltenen Fraktionen wurde schon vor einigen Jahren angegeben, dafs dabei eine Trennung des vom Fibrinoglobulin befreiten Globulins in zwei Fraktionen möglich sei, von denen die eine unterhalb, die andere oberhalb 34 Proz. Sättigung ausfiel. Dieselbe Trennungsmethode ist unabhängig von uns von E. P. Pick angewandt worden. In allerjüngster Zeit hat auch Rostoski bei Untersuchungen über Präcipitine eine Zerlegung der Globuline mit Ammonsulfat versucht.

Wir haben eingehendere methodische Versuche über die Fraktionierung der Blutglobuline angestellt, zumal sich unterdessen

die Ammonsulfatmethode zur Trennung der Enzyme, Toxine und Antitoxine bewährt hat. Bei diesen neuen Versuchen ergab es sich, dafs das Globulin sich hinreichend scharf durch wiederholte Aussalzung in drei Fraktionen zerlegen läfst, deren Fällungsgrenzen 28 bis 36, 33 bis 42, 40 bis 46 sind. Man sieht, dafs die obere und untere Grenze der mittleren Fraktion kollidieren. Es stellte sich weiterhin heraus, dafs die obere Fällungsgrenze der einzelnen Fraktionen konstant ist, während die untere Grenze in weitem Umfange schwankt. Sie liegt um so tiefer, je höher die Konzentration der Globulinlösung ist. Hieraus ergiebt sich, dafs man eine gute Trennung der Substanzen blofs in stark verdünnter Lösung herbeiführen kann, da hierbei die Interferenz der Fällungen vermieden wird. Was die chemische Charakterisierung der Globuline anlangt, so zeigen sie alle drei sämtliche typischen Eiweifsreaktionen. Alle drei geben Molischs Reaktion stark, die erste Fraktion anscheinend besonders stark. Eine chemische Differenzierung der Globulinfraktionen ist bisher nicht möglich gewesen; immerhin weisen einzelne Befunde auf ihre Möglichkeit hin, z. B. die Kalkbindung durch das Pseudoglobulin (Fuld und Spiro) und das von E. Zunz gefundene verschiedene Verhalten bei der Pepsinverdauung. Dabei möchten wir bemerken, dafs nach unserer Erfahrung die nativen Globuline der Trypsinverdauung einen sehr energischen Widerstand entgegensetzen, jedoch sich auf diese Weise weiter spalten lassen, wenn sie vorher mit Pepsin behandelt sind, ein Verhalten, wie es auch nach eigenen Versuchen in gewissem Grade der Leim zeigt.

Die chemische Analyse ergab folgende Werte (auf aschefreie Substanz berechnet):

Fraktion:	C %		H %		S %	N %	C:N
30 bis 37 Proz. Sättigung . .	52,68,	52,56	7,65,	7,75	1,13	16,03	3,28
37 „ 44 „ „ . .	50,48,	50,35	7,78,	7,72	0,98	15,5	3,25
44 „ 50 „ „ . .	47,52,	47,40	8,14,	8,01	0,92	14,45	3,28

Die erheblichen Differenzen im C- und N-Gehalt weisen auf eine Verschiedenheit der Globuline hin; da das Verhältnis C:N aber konstant ist, ist zunächst an einen verschiedenen Wassergehalt der Körper zu denken. Dabei ist zu bemerken, dafs die Trocknung bei allen drei Präparaten möglichst gleichmäfsig vorgenommen wurde (Alkohol, Äther, dann bei 60°, 80° und 105° C.). Sie enthielten als leicht abspaltbaren Stickstoff : 1,31 bezw. 1,168

und 1,026 Proz., d. h. vom Gesamtstickstoff 7,057 bezw. 7,532 und 7,099 Proz. Für die optischen Konstanten ergaben sich jedoch Differenzen. Die erste Fraktion zeigt $\alpha_D = 49^0$, die zweite $\alpha_D = 41^0$, die dritte $\alpha_D = 42^0$. Bezüglich des Koagulationspunktes liefsen sich keine prägnanten Differenzen ermitteln. Er liegt bei 5 proz. Ammonsulfatlösung zwischen 70 und 75^0.

Als wichtigstes Merkmal der Globuline hat, wie schon hervorgehoben wurde, bis zu der Zeit, wo Hammarsten ihre Aussalzbarkeit mit Magnesiumsulfat zeigte, die Thatsache gegolten, dafs sie durch Verdünnen bezw. durch Einleiten von Kohlensäure oder Hinzufügen von Essigsäure fällbar sind.

Wir können von keiner der drei Globulinfraktionen sagen, dafs ihr allein diese Eigenschaft zukommt, denn wir haben gelegentlich von allen drei Fraktionen Präparate erhalten, welche die bezeichnete Fällbarkeit durch Salzentziehung und durch Säurezusatz zeigten, und ebenso auch solche, welche sie nicht zeigten. Wir haben wohl diese sogenannten typischen Globulineigenschaften öfter und stärker ausgesprochen bei der ersten Fraktion als bei den folgenden gesehen, was uns dazu führte, die erste als ein „Euglobulin“, die folgenden als „Pseudoglobulin“ zu bezeichnen, wir müssen jedoch Hammarsten vollkommen beistimmen, dafs auch die höhere „Pseudofraktion“ derart fällbares Globulin enthalten kann. Woher es rührt, dafs dieselbe Fraktion bisweilen diese Fällbarkeit zeigt, bisweilen nicht, darüber können wir nichts Bestimmtes aussagen. Schon Hammarsten hat gegenüber Burckhardt nachgewiesen, dafs im Serum Bestandteile sind, welche die Löslichkeit und Fällbarkeit der Eiweifskörper wesentlich beeinflussen. Vielleicht gehören zu diesen Stoffen die Salze; dafs die im Blute vorhandenen Seifen auf die Fällbarkeit der Globuline von grofsem Einflufs sind, hat K. A. H. Mörner bewiesen. Vielleicht hält ein Eiweifskörper andere in Lösung, wie dies von anderen Kolloiden bekannt ist. Andererseits besteht die Möglichkeit, dafs die Zahl der Globuline eine noch gröfsere ist, eine Annahme, für die E. Freund und J. Joachim in einer soeben erschienenen Arbeit (Centralblatt für Physiologie 1902, Heft 11) eintreten. Die Vermutung, dafs an diesen Abweichungen die Gegenwart von Kalksalzen oder Phosphaten Schuld trägt, liefs sich nicht sicher stellen. Wir haben in den Pseudoglobulinfraktionen öfter, aber nicht immer, Calcium oder Calciumphosphat gefunden, dieselben aber auch gelegentlich in der Euglobulinfraktion gesehen.

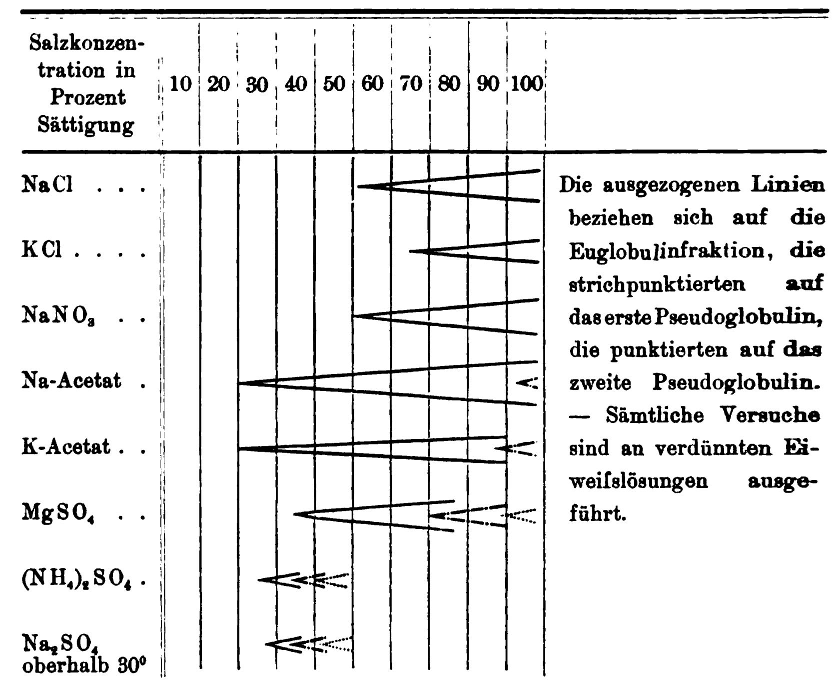
Da die bisher angestellten Versuche zu einer chemischen Differenzierung der drei Eiweifskörper nicht ausreichen, erhebt sich die Frage, auf welche der ermittelten Eigenschaften mehr Wert zu legen ist, auf die übereinstimmenden oder auf diejenigen, welche Verschiedenheiten ergeben.

Als gemeinsam kommt hauptsächlich die erwähnte typische Fällbarkeit durch Salzentziehung in Betracht, als trennend das Verhalten gegen Ammonsulfat. Wenn wir im folgenden dazu gelangen, die Fraktionierung mit Ammonsulfat als mafsgebend zu betrachten, so können wir uns insofern auf Hammarsten stützen, als er gezeigt hat, dafs die Fällbarkeit durch Dialyse von noch unbekannten Verhältnissen abhängig ist und daher kein sicheres Unterscheidungsmerkmal abgeben kann. Wir wollen namentlich an die Versuche Hammarstens erinnern, nach denen auch das Kasein durch Verunreinigung mit Serumbestandteilen die Löslichkeit der Globuline in Neutralsalzlösungen annehmen kann. Während somit das bisher als typisch geltende Unterscheidungsmerkmal zwischen Globulin und Albumin nicht mehr als solches gelten darf, hat sich uns die Salzfällung als ein Mittel bewährt, das unter gleichen Bedingungen immer gleiche Resultate liefert. Gleichwohl haben wir versucht, die bei der Ammonsulfatfraktionierung erhaltenen Ergebnisse durch weitere Versuche zu stützen. Als solche führen wir zuerst die mit anderen Salzen an. Hammarsten hat schon gezeigt, dafs durch wiederholte Fällung mit gröfseren Kochsalzmengen eine durch Sättigung mit Chlornatrium quantitativ fällbare Fraktion zu erhalten ist. Einen kurzen Überblick über unsere Versuche giebt folgende Tabelle (S. 282).

Alle Versuche wurden mit stark verdünnten Lösungen ausgeführt. Wir erwähnen das besonders, da in konzentrierten Lösungen die untere Fällungsgrenze sich aufserordentlich stark nach unten verschiebt, ein Verhalten, auf das gelegentlich gegen die Salzfraktionierung gemachte Einwände zurückzuführen sind. Im einzelnen heben wir hervor, dafs NaCl, KCl, $NaNO_3$ nur die erste Fraktion aussalzen, während die zweite und dritte in verdünnter Lösung nicht ausgesalzen werden. Kalium- und Natriumacetat salzen die Fraktionen 2 und 3 nicht augenblicklich aus, wohl aber nach längerem Stehen. Das wasserfreie Na_2SO_4 *) liefert bei 32° Fällungsgrenzen, die denen des Ammonsulfats aufserordentlich ähn-

*) Über die Verwendung des wasserfreien Natriumsulfats zur Fraktionierung vergl. eine bei Hopkins angefertigte Arbeit von Pinkus. Journ. of Physiology 1901.





lich sind. Noch geeigneter für eine Fraktionierung ist vielleicht das Magnesiumsulfat, da hier die Fällungsgrenzen weiter auseinander liegen. Trotzdem haben wir für die folgenden Untersuchungen das Natriumsulfat als das expeditivere Material bevorzugt.

Die quantitative Bestimmung der Globulinfraktionen konnten wir nach zwei Methoden vornehmen, entweder indem wir an derselben Serumportion nacheinander die Fraktionierung vornahmen, oder indem wir einzelne Serumportionen bis zu den aufeinanderfolgenden Sättigungsgraden mit Salzlösung versetzten. Die beiden Methoden, die wir als Succedan- und Simultanfällung bezeichnen, ergaben gleichmäfsig in einer Reihe von Versuchen für konzentrierte Lösungen verschiedene Resultate*).

Es wurden für das Gesamtglobulin bei der Succedanfällung niedrigere Werte erhalten als bei der Simultanfällung, ein Verhalten, das wohl hinreichend erklärt wird dadurch, dafs ein massiger Niederschlag viel Kolloide mitreifst, während ein geringer Niederschlag die filtrierende Eiweifslösung so gut wie gar nicht beeinflufst.

*) Nur bei der Simultan-, nicht bei der Succedanfällung erhält man in der Albuminfraktion krystallisierendes Eiweifs.

Da unsere Versuche, welche bisher wesentlich der Ausarbeitung der Methode galten, an Pferdeblut angestellt wurden, wovon uns hinreichende Quantitäten zur Verfügung standen, so haben wir die Simultanfällung der Succedanfällung vorgezogen, um Zeit zu ersparen. Bezüglich der Eiweifsbestimmung haben wir uns mit der Kjeldahlmethode begnügt, da der Stickstoffgehalt der einzelnen Globuline untereinander ziemlich gleich ist. Wir fanden ferner, dafs in 100 cm³ Serum etwa 40 mg nicht aussalzbarer Stickstoff vorhanden sind. Wir haben mit der dargelegten Methodik den Globulin- und Albumingehalt von Serum und Plasma desselben Tieres bestimmt.

Dabei ergaben sich in einem Vorversuch, der unter Ausschlufs der Verdünnung ausgeführt wurde, folgende Zahlen:

Stickstoffgehalt entsprechend cm^3 $^1/_{10}$-Normal-NH_3	Im Serum gefunden	Im Plasma gefunden	Im Plasma berechnet
Gesamtstickstoff	93,2	71,2	101,3
Bei 30 Proz. Sättigung fällt aus .	29,9	27,2	38,7
Albuminstickstoff	34,0	23,9	34,0

Die im vierten Stab angeführten Zahlen sind unter der Annahme berechnet, dafs der N-Gehalt der Albuminfraktion im Serum und Plasma gleich ist. Zu nahezu denselben Zahlen gelangt man bei einer Berechnung, der das Volumen des Blutplasmas und die stattgehabte Verdünnung durch Oxalat zu Grunde liegt. Dabei ergiebt sich eine Differenz im Stickstoffgehalt von 8,1 × 1,4 mg N zwischen Plasma und Serum, welche offenbar dem ausgeschiedenen Fibrin entspricht. Da die Muttersubstanz des Fibrins, das Fibrinogen, in der bei 30 Proz. Sättigung ausfallenden Fraktion anzunehmen ist, so finden wir als Bestätigung dieses Befundes, dafs auch die Differenz zwischen dieser Fraktion des Plasmas und Serums eine ähnliche Zahl ergiebt, nämlich 8,8 × 1,4 mg N. Hervorheben möchten wir noch, dafs sich nach dieser Rechnung der Globulingehalt des Serums zu 53,5 Proz., der des Plasmas zu 66,4 Proz. ergiebt, was mit den Angaben Hammarstens gut übereinstimmt. Dafs die bei 30 Proz. ausfallende Fraktion im unverdünnten Plasma mehr, im Serum nur etwas weniger als die Hälfte des Gesamtglobulins (Gesamt-N — Albumin-N) darstellt, erklärt sich aus der hohen Konzentration der Eiweifslösung, d. i. des nativen Serums. In konzentrierter Lösung wirken zwei Fehlerquellen ein, nämlich die Verschiebung der unteren Fällungsgrenzen nach unten und die schon erwähnte Mitfällung sonst löslicher Eiweifskörper durch voluminöse Niederschläge*).

*) Der bei konzentrierten Lösungen beobachtete Unterschied zwischen Simultan- und Succedanfällung verschwindet bei hinreichender Verdünnung.



Ein an zehnfach verdünnter Lösung angestellter Versuch ergab folgende Resultate:

Stickstoffgehalt entsprechend cm^3 $^1/_{10}$-Normal-NH_3	Für Serum gefunden	Für Plasma gefunden	Für Plasma berechnet
Gesamtstickstoff pro 5 ccm	51,5	36,0	56,35
Fraktion I — bis 30 Proz. Sättigung	0,8	3,5	5,48
„ II 30 „ 36 „ „	7,4	3,9	6,11
„ III 36 „ 44 „ „	15,1	9,3	14,56
„ IV 44 „ 50 „ „	2,9	3,2	5,01
Albuminstickstoff	25,2	16,1	25,2

Ähnliche Zahlen, wie sie in dieser Tabelle enthalten sind, haben wir auch bei anderen Versuchen gefunden.

Als Differenz zwischen Plasma und Serum ergiebt sich pro 10 cm^3 ein Fibringehalt entsprechend 9,7 cm^3 $^1/_{10}$-Normal-NH_3, als Differenz zwischen der I. Fraktion *) von Serum und Plasma die Zahl 9,36, also eine durchaus hinreichende Übereinstimmung. Aus unseren Zahlen läſst sich im allgemeinen ein Fibrinogengehalt von 0,8 g in 100 Plasma berechnen. Der Globulingehalt des Plasmas entspricht 55 Proz., der Albumingehalt 45 Proz. des Gesamtstickstoffs. Auffallend ist, daſs die IV. Fraktion im Plasma immer reichlicher vorhanden ist als im Serum. Eine Erklärung für dieses wiederholt von uns beobachtete Faktum können wir vorderhand nicht geben, glauben jedoch nicht, daſs es auf einem Fehler der Methodik beruht, da Fraktion IV bei der Gerinnung um ebenso viel abnimmt, als II und III zunehmen.

Wir glauben somit dargethan zu haben, daſs die Aussalzungsmethode sowohl die qualitative, als auch die quantitative Trennung mehrerer Globulinfraktionen ermöglicht und auch die einzige zuverlässige Methode bildet, um Albumine und Globuline zu trennen. Die Fällung durch Salzentziehung oder Ansäuerung dagegen erhält man nur unter bestimmten, noch unbekannten Bedingungen bei den verschiedenen Globulinen; ihr Eintreten ist für diese charakteristisch, ihr Ausbleiben beweist aber nichts gegen die Anwesenheit von Globulinen.

Da sich aus dem Pferdeserum mit einer ganzen Reihe von Salzen übereinstimmend drei durch ihre Fällungsgrenzen und zum Teil durch ihre optische Wirksamkeit verschiedene Globulinfraktionen gewinnen lassen, kann weiter kein Zweifel bestehen,

*) Bei der Gerinnung des Plasmas sind demnach die Globuline nicht beteiligt.

dafs das „Serumglobulin“ ein Gemenge von mindestens drei verschiedenen Eiweifskörpern darstellt. Dafs dieselben in ihrer Zusammensetzung wenig oder gar nicht verschieden zu sein scheinen, kann um so weniger ein Hindernis sein, diese Unterscheidung festzuhalten, als bei den Eiweifskörpern wie bei anderen Kolloidstoffen bereits Verschiedenheiten, welche in der Zusammensetzung nicht zum Ausdruck kommen, ihr Verhalten gegen Lösungsmittel, vielleicht aber auch ihr Verhalten bei physiologischen Vorgängen einschneidend beeinflussen können.

Litteratur.

A. E. Burckhardt, Archiv f. exp. Path. u. Pharm. **16**.

E. Fuld und K. Spiro, Ztschr. f. physiol. Chemie **31**.

O. Hammarsten, Pflügers Archiv **17**, **18**, **19**, **22**, **30**; Ztschr. f. physiol. Chemie **2**, **28**. Ergebnisse der Physiologie **1**, 330.

E. Marcus, Ztschr. f. physiol. Chemie **28**.

K. A. H. Mörner, Ztschr. f. physiol. Chemie **34**, 253 bis 265.

E. P. Pick, Diese Beiträge **1**.

Rostoski, Verhdlg. d. phys.-med. Ges. zu Würzburg **35**.

S. Wallerstein, Inaug.-Dissert. Strafsburg 1902.

Strafsburg i. E., Ende Juli 1902.

Kürzere Mitteilungen.

2. Über den Jodgehalt von Knochentumoren mit Schilddrüsenbau.

Von Dr. med. **Edgar Gierke.**
(Assistent am pathologischen Institut zu Heidelberg.)

Die letzten Jahrzehnte haben eine nicht unbedeutende Anzahl von Veröffentlichungen gezeitigt, die eine Form rätselhafter, durch ihren schilddrüsenartigen Bau charakterisierter Knochentumoren betreffen. Besonders die chirurgische Litteratür hat ihnen ein grofses Interesse entgegengebracht, da die operative Therapie hier grofse Erfolge aufzuweisen hat im Gegensatz zu allen anderen Fällen, in denen die exstirpierte Geschwulst sich histologisch als Metastase zu charakterisieren scheint und dem primären Tumor nicht zu Leibe gegangen wird. Es handelt sich um scheinbar primär myelogene Sarkome, die den Knochen schalig auftreiben und zerstören; häufig ist aufser ihnen selbst durch die Sektion im ganzen Körper kein Tumor auffindbar, manchmal finden sich Metastasen in Lymphdrüsen, Lungen und Knochen, selten in anderen Organen. Erst die mikroskopische Untersuchung führt zu einer Änderung der Diagnose, indem statt des erwarteten Sarkoms sich das charakteristische Bild einer kolloiden oder parenchymatös wuchernden Struma darbietet, meist ganz ohne karcinomatöse oder verdächtige Stellen. Erst daraufhin wird dann die Schilddrüse am Lebenden oder an der Leiche untersucht, meist eine strumöse Vergröfserung, in einigen Fällen auch völlig normale Gröfse konstatiert. Die ausgesprochene klinische Benignität, das Unverändertsein der Schilddrüse viele Jahre nach Entfernung des Knochentumors, mehrfach auch die genaue histologische Untersuchung scheinen gegen eine primär maligne Neubildung der Schilddrüse zu sprechen. Trotzdem hält die Mehrzahl der Autoren an dieser Annahme fest, von der Erfahrung ausgehend, dafs vielen Schilddrüsenadenomen ihr benigner oder maligner Charakter allein aus dem histologischen Bilde nicht angesehen werden kann, und fafst die Knochentumoren als Metastasen eines latenten Adenocarcinoms der Schilddrüse auf. Dagegen sprechen nun die Erfahrungen, die aus dem Studium der echten Schilddrüsenkrebse, und überhaupt der malignen

Geschwülste hinsichtlich ihres Verbreitungsmodus abstrahiert werden können.

Da nun schilddrüsenähnliche Bilder unter Umständen auch durch Tumoren andersartiger Provenienz nachgeahmt werden können, ist auch eine Reihe einschlägiger Fälle mit völlig abweichender Auffassung veröffentlicht worden, indem dann meist ein Zusammenhang mit Lymphgefäſsen (Lymphangiosarkome) angenommen worden ist. Weder für die eine noch die andere Auffassung ist bisher ein vollgültiger Beweis geführt, ja überhaupt versucht worden.

So lag es nahe, bei zwei derartigen Wirbelsäulentumoren, die ich Gelegenheit hatte zu untersuchen, und die beide zu Kompressionsmyelitis geführt hatten, der eine bei bestehender klinisch und anatomisch harmloser Struma, der andere ohne Schilddrüsenvergröſserung, durch eine chemische Untersuchung ihrer Natur näher kommen zu wollen. Sind wir doch gerade bei der Schilddrüse — und hier handelte es sich beidemal um typisch strumös gebaute, kolloidreiche Tumoren — in der glücklichen Lage, spezifische Substanzen zu kennen.

Infolge der Aufbewahrung der Organe in Alkohol muſste ich auf eine Darstellung der spezifischen Kolloideiweiſse verzichten und mich mit dem Nachweise des elementaren Jods nach Baumanns, von Oswald etwas modifizierter Methode begnügen. Dieser gelang denn auch in allen fünf Proben des ersten, in einer des zweiten Falles; und zwar entsprachen 20 g Tumor der kolorimetrischen Schätzung nach etwa 5 mg Jodkalium, etwas mehr als in der unter gleichen Bedingungen aufbewahrten Schilddrüse des einen Falles; genauere quantitative Bestimmungen unterblieben. Sämtliche Kontrollproben, teils von Organen, die in derselben Fixierungsflüssigkeit aufbewahrt waren, teils von echten primär myelogenen Sarkomen fielen völlig negativ aus.

In Lungen- und Lymphdrüsenmetastasen eines Adenocarcinoms der Schilddrüse hatte Ewald schon 1896 positiven Jodnachweis geführt, dessen Wert leider durch das völlige Fehlen des histologischen Befundes beeinträchtigt wird. Erinnert sei auch an die von v. Eiselsberg klinisch beobachtete vikariierende Funktion von Schilddrüsenmetastasen, die uns durch den Jodgehalt verständlich wird.

Mit dem Hinweise auf diese wichtige Stütze für die Schilddrüsennatur unserer Tumoren muſs ich mich hier begnügen, betreffs aller übrigen sich hier aufdrängenden Fragen, speziell nach der Anwendbarkeit analoger chemischer Diagnose für andere Geschwülste, nach der interessanten Fähigkeit maligner Geschwülste, unter Umständen die spezifische Funktion ihrer Mutterzellen beizubehalten, nach der Stellung unserer Tumoren in der Onkologie, ihrem Zusammenhang mit der Schilddrüse u. a. auf eine ausführlichere anatomische Arbeit verweisend*).

Hier sollte nur über die den physiologischen und pathologischen Chemiker interessierenden Thatsachen in Kürze berichtet werden.

*) Erscheint demnächst in Virchows Archiv.

3. Über die Silberverbindungen des Kaseins*).

Von F. Röhmann und L. Hirschstein.

(Aus dem chemischen Laboratorium des physiologischen Instituts zu Breslau.)

Von Millon und Commaille**) wurden bereits im Jahre 1865 nicht nur Verbindungen des Kaseins mit den Alkalien und Erdalkalien, sondern auch solche mit den Metallen hergestellt. Eine Silberverbindung erhielten sie in der Weise, dafs sie eine säurefreie Lösung von Silbernitrat in eine ammoniakalische Kaseinlösung eintrugen. Der hierbei entstehende weifse Niederschlag war unlöslich in Wasser und enthielt „ein Äquivalent Silberoxyd". Aufser diesem unlöslichen Silbersalz des Kaseins existieren lösliche Silberverbindungen, welche von F. Röhmann und A. Liebrecht kurz beschrieben worden sind. Sie entstehen, wenn man Kaseinnatrium und Silbernitrat in einem Verhältnis mischt, dafs kein Niederschlag entsteht, und diese Lösung dann mit Alkohol fällt***), oder wenn man die unlösliche Kaseinsilberverbindung in den Alkalisalzen anorganischer oder organischer Säuren (auch Kaseinalkali) löst und wieder die Lösung mit Alkohol fällt†). Die Lösungen der löslichen Kaseinsilberverbindungen zeigten die merkwürdige Eigenschaft††), dafs das Silber in ihnen „maskiert" war; es entstanden in ihnen keine Niederschläge mit Chloriden oder kaustischen Alkalien, bei Zusatz von Schwefelalkalien erfolgte keine Abscheidung von Schwefelsilber, sondern nur eine Braunfärbung der Lösung..

Bei einer erneuten Untersuchung dieser Verbindungen ergab sich, dafs die unlösliche Kaseinsilberverbindung noch den Charakter einer Säure hat, und dafs die durch Alkalien aus ihr erhaltenen löslichen Verbindungen Salzen dieser Säure entsprechen. Die Säure wird im folgenden als Argentumkasein bezeichnet, ihre Salze als Argentumkaseinnatrium, Argentumkaseincalcium, Argentumkaseinsilber u. s. w.

Darstellung des Argentumkaseins. Eine für Phenolphtalein neutrale 2- bis 4prozentige Kaseinlösung wird in einen Überschufs von Silbernitratlösung eingetragen, der entstehende Niederschlag wird auf dem Filter gesammelt und so lange mit destilliertem Wasser ausgewaschen, bis sich mit Diphenylamin keine Salpetersäure mehr im Filtrat nachweisen läfst.

Zusammensetzung des Argentumkaseins. Von zwei Präparaten, welche aus einer neutralen Lösung von selbstdargestelltem Kasein in Natronlauge gewonnen worden waren, enthielt das eine auf Trockensubstanz berechnet, 8,76 Proz. Ag, ein zweites 9,66 Proz. Ag.

---

*) Vergl. die Inaug.-Dissert. von L. Hirschstein, Über therapeutisch verwendete Silberverbindungen, insbesondere über Silber-Eiweifsverbindungen mit spezieller Berücksichtigung der Silberverbindungen des Kaseins. Breslau 1902.

**) Compt. rend. 61, 221 (1865).

***) Deutsches Reichspatent 82951. 6. Mai 1894.

†) Deutsches Reichspatent 88121. 11. April 1895.

††) Siehe auch Arthur Liebrecht, Über Argonin. Therapeut. Monatshefte, Juni 1895.

Zwei Präparate, die aus einer Lösung von Kasein in Ammoniak dargestellt worden waren, enthielten 8,54 und 8,10 Proz. Ag, zwei aus Kaseincalcium dargestellte ergaben einen erheblich niedrigeren Silberwert, was, wie der Calciumgehalt des Präparates zeigte, auf einer unvollständigen Umsetzung des Kaseincalciums mit dem Silbernitrat beruhte.

Es wurden weiter zwei Präparate analysiert, die aus Natriumlösungen von Kasein-Höchst dargestellt worden waren. Letzteres unterschied sich von dem selbstdargestellten Kasein durch eine etwas geringere Acidität, seine Lösungen in Alkalien waren etwas weniger opalescent, beim Lösen hinterliefs es meist einen geringen schwerer löslichen Rückstand. Dafs es aber jedenfalls nur wenig verändert war, zeigte sich darin, dafs man aus ihm in der von Röhmann und Courant*) beschriebenen Weise mit Lab typisch gerinnende Lösungen erhielt. Die Unterschiede zwischen dem Höchster und dem selbstdargestellten Kasein scheinen nur durch ein etwas stärkeres Trocknen bedingt zu sein.

Die aus Höchster Kasein dargestellten Präparate von Argentumkasein enthielten, auf Trockensubstanz berechnet, 10,81 und 10,36 Proz. Ag.

Der Kohlenstoffgehalt des einen dieser Präparate ergab sich, auf silberfreie Trockensubstanz berechnet, zu 53,10 Proz., der Wasserstoff zu 7,29 Proz. Nach Hammarsten enthält Kuhkasein 52,96 Proz. C und 7,05 Proz. H. Die Bildung des Argentumkaseins erfolgt also ohne nachweisbare Zersetzung des Kaseins (vergl. die Analysen des Argentumkaseinsilbers).

Eigenschaften des Argentumkaseins. Das Argentumkasein bildet ein weifses, staubfeines Pulver, von dem sich in 100 ccm Wasser nur 0,47 g lösen. Es löst sich aber leicht in Alkalien auf.

Die Löslichkeit in Alkalien führte zu der Beobachtung, dafs das Argentumkasein eine erhebliche Acidität besitzt. Es banden, auf Trockensubstanz berechnet, 100 Teile

Präparat I aus selbstdargestelltem Kasein	1,48 Na
„ II „ „ „	1,99 „
Präparat I aus Höchster Kasein	0,87 „
„ II „ „ „	1,29 „

Die Präparate zeigen also in Bezug auf die Acidität, ebenso wie in Bezug auf den Silbergehalt recht erhebliche Unterschiede, für welche die Ursache noch näher festgestellt werden mufs.

Das Argentumkasein löst sich auch in Ammoniak, es löst sich ferner in dem für Phenolphtalein neutralen Natriumsalz des Kaseins, ein Hinweis darauf, dafs es eine stärkere Säure als das Kasein ist.

Die Silbermengen, welche das Argentumkasein enthält, entsprechen der Acidität des Kaseins. So banden vom Höchster Kasein 100 g 12,15 g Silber, welche 2,595 g Natrium äquivalent sind, während die Acidität 2,65 g Natrium entprach. Man mufste hiernach zunächst, wie das ja auch nach der Art der Darstellung am wahrscheinlichsten war, erwarten, dafs sich ein den neutralen Alkali- und Erdalkalisalzen entsprechendes, neutrales Silbersalz des Kaseins gebildet hatte. Dies war aber nicht der Fall. Denn das Argentumkasein reagiert, wie erwähnt, noch sauer. Es mufs eine andere Umsetzung stattgefunden haben.

*) Arch. f. d. gesamte Physiol. 50.

Hierfür spricht auch, dafs die Lösungen des Argentumkaseins nicht die Ionenreaktionen des Silbers geben. Es entsteht in ihnen durch Chloride kein Niederschlag von Chlorsilber, mit Natronlauge kein Niederschlag von Silberoxyd, mit Schwefelammonium färben sich die Lösungen des Argentumkaseins dunkelbraun. Das Silber verhält sich in dem Argentumkasein wie das Eisen in der Ferrocyanwasserstoffsäure. Wir können es auffassen als eine komplexe Säure, deren komplexes Anion elektrisch neutrales Silber enthält. Bei der Umsetzung, welche zwischen dem Kaseinnatrium und dem Silbernitrat erfolgt, treten sämtliche Natriumatome aus der Verbindung mit dem Kasein heraus und vereinigen sich mit dem Salpetersäurerest; das Filtrat des Argentumkaseins reagiert neutral; beim Eintritt der Silberatome verliert das Kasein nur einen Teil seiner Acidität, der Rest wird durch die Verbindung mit dem Silber verstärkt. Die für Phenolphtalein neutralen Lösungen des Argentumkaseins sind als die Alkalisalze dieser unlöslichen Säure zu betrachten. Setzt man zu ihnen schwefelsaures Kupfer, Eisenchlorid, Silbernitrat u. a., so entstehen Niederschläge, welche die entsprechenden Metallsalze des Argentumkaseins darstellen. Mit dem schwächer elektrolytisch dissoziierten Quecksilberchlorid entsteht nur Opalescenz.

Von den unlöslichen Metallsalzen wurde nur das Silbersalz näher untersucht.

Argentumkaseinsilber. Zu seiner Darstellung wurde eine für Phenolphtalein neutrale Lösung von Argentumkasein in eine Lösung, welche etwas mehr als die berechnete Menge Silbernitrat enthielt, eingetragen. Es entstand ein Niederschlag, welcher mit destilliertem Wasser bis zum Verschwinden der Silberreaktion gewaschen und mit Hülfe von Alkohol und Äther zur Trockne gebracht wurde.

Das Argentumkaseinsilber bildet ein Pulver, das nicht wie das Argentumkasein rein weifs ist, sondern einen Stich ins Gelbliche hat. Durch Licht wird es gebräunt. Es ist in Wasser so gut wie unlöslich, löst sich aber in Ammoniak. Neutralisiert man die ammoniakalische Silberlösung mit Salpetersäure, so ruft Kochsalz einen reichlichen Niederschlag von Chlorsilber hervor; bei Zusatz von Natronlauge erfolgt Abscheidung von Silberoxyd. In dem Argentumkaseinsilber ist also ein Teil des Silbers ional gebunden.

Die Menge des Silbers, welche bei dem Übergange des Argentumkaseinnatriums in das Argentumkaseinsilber gebunden wird, entspricht der Acidität des Argentumkaseins. Das Argentumkaseinsilber aus Kasein-Höchst enthielt 14,94 Proz. Ag, das Argentumkasein 10,83 Proz. Die Differenz 4,11 ist äquivalent 0,87 g Natrium, einer Menge, mit welcher Präparat I aus Kasein-Höchst eine für Phenolphtalein neutrale Lösung gab.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

45,27 Proz. C, 5,73 Proz. H, 13,25 Proz. N.

Berechnet man diese Werte auf silberfreie Trockensubstanz, so erhält man:

53,22 Proz. C, 6,74 Proz. H, 15,58 Proz. N.

Diese Werte stimmen mit denen des Argentumkaseins gut überein.

XIV.

Untersuchungen über das fettspaltende Ferment des Magens.

Von **Waldemar Stade**, appr. Arzt.

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik des Herrn Geheimrat Prof. Dr. Riegel.)

Schon im Jahre 1858 hatte Marcet[1]) gefunden, dafs im Magen aus neutralem Fett Spuren von Fettsäuren abgespalten werden. In seiner Arbeit, die sich vorzugsweise mit dem Einflufs der Galle auf die Fette beschäftigt, wies er nach, dafs die Galle nur bei Gegenwart freier Fettsäure emulsionsbildend wirkt. Da ihm aber die fettspaltende Wirkung des Pankreassaftes unbekannt war, mufste er annehmen, dafs schon im Magen aus Neutralfetten Fettsäuren abgespalten würden. In der That gelang ihm an Hunden der Nachweis dieser neuen Funktion des Magens. Er fand, dafs das Ätherextrakt des Mageninhaltes von Hunden, die mit neutralem Fett gefüttert worden waren, im Gegensatz zu dem Ausgangsmaterial in warmer Galle löslich war und beim Abkühlen eine Emulsion gab.

Diese Angaben Marcets wurden 22 Jahre später von Cash[2]) bestätigt. Cash zeigte nicht nur, dafs eine — unter seinen Versuchsbedingungen geringe — Fettspaltung im Magen stattfindet, sondern es gelang ihm auch, das Gleiche mit einem Extrakt der Magenschleimhaut im Reagenzglas zu beweisen. Auf Grund seiner Untersuchungen sprach er zuerst die Vermutung aus, dafs es sich hier um eine fermentative Wirkung handle.

Obgleich Ogata[3]), der wie Cash in Ludwigs Laboratorium arbeitete, diese Angaben bestätigte, hielten spätere Autoren diesen Vorgang für völlig unbedeutend und auf Bakterienwirkung zurückführbar. So hat Müller[4]), der die Angaben von Cash und Ogata nachprüfte, dem Pankreassaft allein eine fettspaltende

Wirkung zugebilligt, und so haben Klemperer und Scheuerlen[5]) die minimale Spaltung von Öl im doppelt unterbundenen Magen und die etwas gröfsere im dilatierten Magen bei längerem Verweilen für Gärungsvorgänge erklärt. Andere Autoren, wie Klug[6]) und Contejean[7]), haben überhaupt jede Fettspaltung im Magen geleugnet, während Vaughan Harley[8]) trotz Pankreasausschaltung beim Hunde eine Milchfettzerlegung beobachtete; er fand, dafs nach siebenstündigem Verweilen im Magen eine Spaltung von 18,5 Proz. des Milchfettes erfolgt war. Ob er jedoch diese Spaltung für fermentativ oder bakteriell hielt, darüber hat er keine Angaben gemacht.

So viel steht fest, dafs man im allgemeinen die Überzeugung hegte, dafs der Magen Fette nicht angreife, und es ist eine Thatsache, dafs man in den meisten Lehrbüchern Angaben über Fettspaltung im Magen vermifst.

Auf dieses Dogma hatte nun von Mering[9]) eine Methode der Resorptionsprüfung im Magen gegründet. Er führte eine Eigelbzuckeremulsion in den Magen ein und wollte, in der Annahme, dafs das Fett im Magen keine Veränderung erleidet, dieses als Standardzahl verwenden, um in Beziehung auf die Fetteinheit die Menge des resorbierten Zuckers zu berechnen.

Bei einer Nachprüfung der von Meringschen Methode machte aber Volhard[10]) einige Beobachtungen, welche in ihm den Verdacht erweckten, dafs das Eierfett im Magen verändert werde. Sie veranlafsten ihn, Ätherextrakte vor und nach dem Aufenthalt der Fette im Magen, welche überdies verschieden aussahen, zu titrieren. Damit war der Grund zur Kenntnis des Magensteapsins und zu Volhards weiteren Untersuchungen gelegt. In seiner ersten Veröffentlichung[10]) that er dar, dafs emulgiertes Fett im Magen in weitgehendster Weise gespalten werde. In seiner zweiten[11]) wies er die fermentative Natur des fettspaltenden Vorganges im Magen nach und untersuchte in seiner dritten[12]) Abhandlung die Eigenschaften dieses Fermentes[14]). Damit hat er auch die negativen Resultate anderer Autoren in überzeugender Weise erklärt. Man hatte bisher dem wässerigen Magensaft nur unemulgierte Fette und Öle dargeboten und damit eine innigere Einwirkung schon aus physikalischen Gründen unmöglich gemacht, während Vaughan Harley zwar Milch benutzte, aber seine Versuche am Hunde machte, dessen Magensaft gewöhnlich so sauer ist, dafs die Fettspaltung sehr beeinträchtigt wird.

Volhards Angaben entsprechen vollkommen den Kenntnissen, die wir von den Eigenschaften der Fermente haben, bis auf einen Punkt; es ist unwahrscheinlich, daſs die Fettspaltung durch das Magensteapsin nicht proportional der Zeit, sondern in unregelmäſsigen Intervallen und ruckweise wachsen soll. Wäre diese Behauptung richtig, so würde sich dadurch das Magensteapsin von allen anderen bekannten Fermenten unterscheiden. Eine Nachprüfung dieser Frage war daher sehr erwünscht. Herr Dr. Volhard hatte die Freundlichkeit, mich mit dieser Aufgabe zu betrauen und den Plan für diese Untersuchungen, welche ich in dem Laboratorium der Klinik des Herrn Geheimrat Professor Dr. Riegel ausführen durfte, zu entwerfen.

1. Methodisches.

Die von Volhard bei seinen Versuchen angewandte und als Anhang zu seiner Habilitationsschrift beschriebene Methode war kurz folgende: Eigelb wurde mit Magensaft verdaut und das Verdauungsgemisch auf Kaolin zweimal 24 Stunden lang getrocknet, danach mit Äther 24 Stunden lang im Soxhletapparat extrahiert. Unsere Untersuchungen bewegten sich zunächst in der Richtung, diese Methode zu vereinfachen und eventuell Fehlerquellen der Extraktionsmethode aufzufinden, auf deren Rechnung vielleicht Ungenauigkeiten der Resultate Volhards zu setzen wären.

Es war zu untersuchen, ob nicht nach Herausnahme der Verdauungsgemische aus dem Wasserbade die Fettspaltung noch weiter fortschreite. Von vornherein war nicht anzunehmen, daſs diese Spaltung, wenn sie überhaupt erfolgte, in der trocknenden Masse erheblich sei. Die Frage war leicht zu entscheiden, wenn man in Parallelversuchen Proben gekocht und ungekocht auf Kaolin brachte.

Erste Versuchsserie.

Versuchsreihe 1. (12. August 1901.)

Versuchsanordnung: Je 5 ccm Magensaft werden mit 10 ccm Eigelblösung (drei Eigelb mit Wasser auf 100 ccm) versetzt und verschieden lange Zeit der Verdauung im Wasserbade bei 40° unterworfen. Nach Herausnahme aus dem Wasserbade wird die eine Hälfte sofort gekocht, die andere ungekocht wie bisher auf Kaolin getrocknet.

Aus den Zahlen der folgenden Tabelle geht hervor, daſs in der Zeit von der Herausnahme aus dem Wasserbade bis zur Benetzung der Patronen mit Äther — die ja schon, weil sie dem nur wasserlöslichen Fermente das Fett entzieht, jenes unwirksam

Soxhletversuch.

Nr.	Verdauungszeit	Behandlung	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren	Prozente der durch Ferment abgespalt. Fettsäuren
1 b	2 Stdn.	ungekocht	29,15	20,2	49,35	59,0
2 b		gekocht	15,2	34,15	49,35	31,0
3 b	6 "	ungekocht	29,9	16,9	46,8	63,8
4 b		gekocht	20,3	24,1	44,4	45,7
5 b	23 "	ungekocht	34,1	13,4	47,5	71,8
6 b		gekocht	24,9	15,5	40,4	61,6

macht — unzweifelhaft während der Trocknung im Kaolin eine recht beträchtliche Fettspaltung stattfindet. Daraus ergiebt sich weiter, dafs die mit der früheren Methode erhaltenen Zahlen nicht der Ausdruck der Fettspaltung in der angegebenen Verdauungszeit sind, sondern der Zeit vom Beginn der Verdauung im Wasserbade bis zum Ende der Trocknung entsprechen.

Während dieser Fehler leicht durch Kochen vermeidbar ist, läfst sich ein anderer der Soxhletschen Extraktionsmethode anhaftender Fehler nicht umgehen, wenn man diese nicht aufgeben will. Schon Pflüger[13]) hat nachgewiesen, dafs die Extraktion der Fette im Soxhletschen Extraktionsapparat stets eine unvollständige ist. Es läfst sich von vornherein annehmen, dafs die Extraktion um so besser sein mufs, je kleiner und je lockerer gefüllt die Patronen sind. Von diesem Gesichtspunkte aus war es leicht, dadurch dafs wir das Fettsäure-Fett-Kaolingemisch auf verschiedene Patronen verteilten, bis zu einem gewissen Grade die Gröfse des Fehlers festzustellen, den die Methode verursachte.

Versuchsreihe 2.

Versuchsanordnung: 170 ccm Eigelblösung (5 : 170) werden mit 60 ccm hyperacidem Magensaft (Acidität: 100 frei, 135 Ges.) in einer Flasche der Verdauung im Wasserbade 10 Stunden lang unterworfen. Danach werden dreimal 20 ccm abgehoben, gekocht, in drei Schälchen mit Kaolin gebracht und nach der Trocknung auf 1, 2 und 3 Patronen verteilt.

Es wurden dabei (vgl. folgende Tabelle) im Soxhletschen Extraktionsapparate erhebliche Mengen von Neutralfett nicht extra-

Nr.	Zahl der Patronen	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1	1	13,3	14,6	27,9	47,7
2	2	17,2	20,7	37,9	45,4
3	3	13,2	28,0	41,2	32,0

biert. Zugleich erhellt aus dem Versuche, dafs Fettsäuren leichter vollständig extrahiert werden als Neutralfette. Je mehr Patronen benutzt werden, um so gröfser wird die extrahierte Menge der Neutralfette, um so kleiner die Prozentzahlen der gespaltenen Fette.

Es erscheint aus diesem Grunde das Soxhletsche Verfahren zur Bestimmung der Wirkung des Magensteapsins nicht sehr geeignet. Dazu kommt noch, dafs es umständlich ist und erst nach verhältnismäfsig sehr langer Zeit zu Resultaten führt, weshalb es für klinische Zwecke ohnehin schlecht zu gebrauchen ist.

Daher war es nötig, nach einer Methode zu suchen, die in kürzerer Zeit zu besseren, fehlerfreieren Ergebnissen führt.

Bisher war darauf Wert gelegt worden, alle im Verdauungsgemische vorhandenen Neutralfette und Fettsäuren quantitativ der Titration zugänglich zu machen. Deshalb war anfangs die Soxhletsche Methode das einzig mögliche Verfahren. Denn wenn man das Verdauungsgemisch auch vollständig in Flasche oder Schütteltrichter ausschütteln konnte, so wäre doch für eine quantitative Bestimmung des Fettes eine mehrfache viel zu umständliche Ausschüttelung nötig gewesen. Es waren aber andererseits die gewonnenen fehlerhaften absoluten Zahlen dazu verwendet worden, die prozentualen Werte der Fettspaltung zu berechnen. Es bedarf zu diesem Zwecke jedoch keineswegs absoluter Zahlen. Nachdem Volhard nachgewiesen hatte, dafs die Fettspaltung annähernd prozentual erfolgt, d. h. dafs von viel oder wenig Fett ungefähr der gleiche Prozentsatz gespalten wird, so schien es erlaubt, nur einen beliebigen Teil des Fettäthers zu titrieren und zu verseifen und so den Prozentgehalt des Äthers an Fettsäuren zu ermitteln. Daher war es empfehlenswert, auf eine Methode zurückzugreifen, die Volhard schon früher angewandt, aber eben deshalb, weil sie keine absoluten Zahlen ergab, wieder verlassen hatte.

Das Prinzip beider Methoden ist das gleiche: die möglichst intensive Benetzung des Verdauungsgemisches mit Äther. Volhard scheiterte mit seinen Versuchen, das Fett mit Äther auszuschütteln, daran, dafs er die gesamte Fettäthermenge verwenden wollte, es aber höchst schwierig, ja unmöglich war, diese vollständig zu gewinnen. Denn so

oft er auch die sich absetzende schmierige weiſse Eiweiſsmasse sowie das Wasser ablaufen lieſs, immer schied sich nach einiger Zeit des Stehens im Abgelaufenen eine Schicht Fettäther ab, die bis dahin im Eiweiſs-Wassergemisch emulgiert war. Andererseits blieb an der Wand des Scheidetrichters von der schmierigen Eiweiſsmasse immer etwas hängen, das, wenn man den Äther ablaufen lieſs, mit hinabgerissen wurde und so den Fettäther verunreinigte. Begnügte man sich jedoch mit einem beliebigen Teil des Fettäthers, so war die Methode brauchbar; denn es war leicht, durch Absitzenlassen den Fettäther rein zu gewinnen.

Wir gingen deshalb folgendermaſsen vor: Gleiche Mengen des Verdauungsgemisches wurden in 100 bis 150 ccm fassende Flaschen gebracht, mit 75 ccm Äther und zur Beschleunigung der Schichtung mit 2 ccm Alkohol übergossen, gut verkorkt und gleich lange geschüttelt. Zum Schütteln diente ein von Volhard konstruierter, im Laboratorium schon verschiedentlich verwendeter durch eine Wasserturbine bewegter Apparat. Sobald sich nach Beendigung des Schüttelns der Äther von dem Verdauungsgemische getrennt und geklärt hatte, wurden 50 ccm desselben in ein Kölbchen abgegossen, mit 75 ccm neutralisierten Alkohols versetzt und mit wässeriger $^1/_{10}$-Normalnatronlauge titriert. Danach wurden 10 ccm Normalnatronlauge zugegeben und die Kölbchen 24 Stunden lang auf kochendem Wasserbade unter dem Rückfluſskühler der Verseifung unterworfen. Die aus den Neutralfetten so gebildeten Seifen wurden durch 10 ccm Normalsalzsäure gespalten, wobei gleichzeitig das überschüssige Alkali gebunden wird, und durch eine zweite Titration die Neutralfette als Fettsäuren bestimmt.

Daneben wurden Parallelversuche mit Extraktion im Soxhletschen Extraktionsapparate angestellt.

Versuchsreihe 3. (7. August 1901.)

Versuchsanordnung: Je 20 ccm Magensaft werden 1. durch Zusatz von Normalsalzsäure auf eine Gesamtacidität von 78 gebracht und auf vier Röhrchen verteilt, 2. nach Zusatz von Phenolphtalëin mit Normalnatronlauge bis zur schwachen Rotfärbung neutralisiert und auf ebenso viel Röhrchen verteilt, 3. gekocht auf vier Röhrchen verteilt. In jedes Reagenzglas werden 10 ccm einer Eigelblösung (5 : 125) zugegeben und alle für $2\,^1/_2$ Stunden in das Wasserbad (41°) gebracht.

Makroskopische Veränderungen zeigen nur die Röhrchen unter 1. Die Emulsion ist zertört, im Gläschen eine gelbe, eben Flocken bildende Masse.

Je zwei Röhrchen von 1, 2 und 3 werden nach beiden Methoden behandelt. Dauer des Schüttelns $3\,^3/_4$ Stunden.

Die dritte Versuchsreihe, deren Resultat die beiden folgenden Tabellen wiedergeben, beweist nichts Neues; sie dient nur als weiteres Beweismaterial für die schon oben erwähnte Thatsache, daſs die Spaltung im Kaolin fortschreitet und die Extraktion nach Soxhlet viel zu kleine Werte giebt. Das erhellt, wenn man die Resultate des Soxhlet-Versuches mit denen des Schüttelversuches vergleicht.

a) Schüttelversuch.

Nr.	Magensaft	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1 a	sauer	6,4	26,5	32,9	19,5
1 b		5,8	24,3	30,1	19,3
2 a	neutral	6,1	31,2	37,3	16,4
2 b		6,5	31,6	38,1	17,1
3 a	gekocht	0,9	26,0	26,9	3,3
3 b		1,2	32,1	33,3	3,6

b) Soxhletversuch.

Nr.	Magensaft	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1 a	sauer	18,5	18,2	36,7	50,4
1 b		20,6	16,75	37,3	55,3
2 a	neutral	16,3	19,2	35,5	45,9
2 b		17,8	18,6	36,4	48,9
3 a	gekocht	1,4	36,0	37,4	3,7
3 b		1,4	35,1	36,5	3,8

Versuchsreihe 4.

Versuchsanordnung: genau wie in der 1. Versuchsreihe, vgl. S. 293. Dauer des Schüttelns 5 Stunden, der Verseifung 23 Stunden.

Schüttelversuch.

Nr.	Verdauungszeit	Behandlung	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1 a	2 Stdn.	ungekocht	10,7	26,15	37,5	29,0
2 a		gekocht	9,2	25,7	34,9	26,3
3 a	6 "	ungekocht	13,15	19,7	32,85	40,0
4 a		gekocht	14,25	21,4	35,65	39,7
5 a	23 "	ungekocht	17,5	13,3	30,8	56,8
6 a		gekocht	20,4	17,8	38,2	53,4

Aus der vierten Versuchsreihe, welche ganz analog der ersten angestellt wurde, nur mit dem Unterschied, dafs das Fett ausgeschüttelt wurde, geht einmal hervor, dafs die Fettspaltung fast sofort in dem Momente der Einwirkung des Äthers aufhört, so dafs bei dieser Schüttelmethode die Zerstörung des Fermentes durch Kochen überflüssig ist. Zweitens erkennt man auch im Vergleich zu den Versuchen der ersten Versuchsreihe, in denen das Ferment durch Kochen zerstört, das Fett aber mit Soxhlet extrahiert wurde, von neuem deutlich, dafs die Soxhlet-Methode zu hohe Werte für abgespaltene Fettsäuren giebt, weil im Verhältnis weniger Neutralfett extrahiert wird. Der folgende Versuch beweist dies sehr deutlich.

Versuchsreihe 4a. (15. August 1901.)

Versuchsanordnung: Die Patronen 4 b und 6 b der ersten Versuchsreihe werden mit je 150 ccm Äther übergossen und ausgeschüttelt. Von 4 b werden 45, von 6 b 50 ccm Äther abgegossen, titriert und verseift.

Nr.	Behandlung	Verdauungszeit	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 45 bezw. 50 ccm Äther	Berechnet auf 150 ccm Äther
4 b	gekocht	6 Stdn.	0,25	1,3	1,55	5,2
6 b	gekocht	23 „	0,25	1,7	1,95	5,5

Addiert man zu den Soxhletversuchen 2 b, 4 b, 6 b der I. Versuchsreihe demnach 0,75 Fettsäure und etwa 5,0 Neutralfett, so viel, als der Extraktion entgangen sind, so erhält man folgende mit den Zahlen der analogen Schüttelversuche (2 a, 4 a, 6 a der 4. Versuchsreihe) annähernd stimmende Werte.

Nr.	Behandlung	Verdauungszeit	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren	Nr.	Behandlung	Verdauungszeit	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
2 a	gekocht und ausgeschüttelt	2 Stdn.	26,3	2 b	gekocht und Soxhlet	2 Stdn.	28,9
4 a	gekocht und ausgeschüttelt	6 „	39,7	4 b	gekocht und Soxhlet	6 „	42,0
6 a	gekocht und ausgeschüttelt	23 „	53,4	6 b	gekocht und Soxhlet	23 „	55,6

Damit war die Brauchbarkeit der Schüttelmethode erwiesen. Es erübrigte nur noch, die gesamte Versuchsanordnung durchzuarbeiten, auf eventuell in Betracht kommende Fehlerquellen zu prüfen und die Methode möglichst zu vereinfachen.

So war daran zu denken, dafs aus dem Verdauungsgemische in den Äther, der sich beim Schütteln ja mit Wasser sättigen mufs, Salzsäure überginge; es könnte in dieser Hinsicht auch der Zusatz von Alkohol von Einflufs sein. Schüttelt man indessen Magensaft mit und ohne Zusatz von Alkohol mit Äther aus, so ist die im Ätherextrakte nachweisbare Säuremenge derart gering, dafs sie sich nur auf Spuren einer $^1/_{10}$-Normalnatronlauge beläuft. Zusatz von einigen Tropfen Silbernitratlösung ruft nur eine geringe Opalescenz hervor. Wenn also thatsächlich auch Salzsäure übergeht, so ist deren Menge so gering, dafs sie vernachlässigt werden kann. Überdies haben wir in der Regel neutralisierten Magensaft verwendet.

Es wäre jedoch noch möglich, dafs der Zusatz von 2 ccm Alkohol derart von Einflufs wäre, dafs im Alkohol lösliche Säuren, wie Glycerinphosphorsäure, in das Ätherextrakt übergingen, welche ohne Zusatz von Alkohol nicht extrahiert würden. Dafs aber auch dies nicht der Fall ist, beweist der folgende Versuch.

Versuchsreihe 5. (19. August 1901.)

Versuchsanordnung: 100 ccm Eigelblösung (3 : 100) werden in einer Flasche mit 50 ccm Magensaft (neutralisiert) im Wasserbade von 41° 6 Stunden lang verdaut. Dann werden 6 mal je 15 ccm mit einer Pipette in Reagenzgläser übertragen und darin gekocht, danach in Flaschen gefüllt und 3 mit, 3 ohne Zusatz von Alkohol mit 75 ccm Äther $3^1/_2$ Stunde lang geschüttelt. Dauer der Verseifung: 24 Stunden.

Nr.	Ausgeschüttelt mit 75 ccm Äther	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1	mit Alkohol	5,6	32,6	38,2	14,7
2	ohne „	5,2	30,3	35,5	14,7
3	mit „	5,5	31,9	37,4	14,7
4	ohne „	5,4	30,7	36,1	15,0
5	mit „	5,7	32,5	38,2	14,9
6	ohne „	4,9	29,0	33,9	14,5

Es geht aber aus diesem Versuche nicht nur hervor, dafs Alkoholzusatz für die Extraktion gleichgültig ist, sondern es zeigt sich auch, wie genau das prozentische Verhältnis abgespaltener Fettsäuren durch die Ausschüttelung aliquoter Mengen ermittelt wird.

Eine wesentliche Vereinfachung der Methode wäre es, wenn es gelänge, auch schon nach kurzer Dauer des Schüttelns richtige prozentische Bestimmungen der im Ätherextrakt vorhandenen abgespaltenen Fettsäuren zu machen. Wie sich aus dem folgenden Versuche ergiebt, ist in der That die Dauer des Schüttelns gänzlich belanglos für das prozentische Ergebnis der Fettspaltung. Es zeigt sich, dafs es auf die Vollständigkeit der Extraktion gar nicht ankommt. Legt man dagegen auf absolute Zahlen Wert, so mufs die Extraktion eine gewisse Zeit lang fortgesetzt werden.

Versuchsreihe 6.

Versuchsanordnung: Doppelversuch. 150 ccm Eigelblösung (5 Eigelb auf 170 aufgefüllt) werden in einer Flasche 10 Stunden lang mit 60 ccm Magensaft (freie HCl 100, Gesamtacidität 135) der Verdauung im Wasserbade von 41° unterworfen; sodann werden je 20 ccm mit der Pipette abgehoben und verschieden lange geschüttelt.

Qualitatives Ergebnis: Die Emulsion ist vollkommen zerstört; in einer trüben, gelben Molke schwimmen gelbe Flocken und ein grofser, gelber, fetter Cylinder. Um mit der Pipette bestimmte Mengen abheben zu können, mufste erst durch Schütteln wieder eine Emulsion hergestellt werden.

Nr.	Dauer und Art des Schüttelns	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1 a	2 Stdn. im Schüttelapparat	14,0	38,5	52,5	26,6
1 b		14,4	39,0	53,4	27,0
2 a	1 Stde.	7,8	20,5	28,3	27,6
2 b	wie 1	12,9	35,6	48,5	26,6
3 a	¼ Stde.	7,7	18,9	26,6	28,9
3 b	wie 1	7,4	19,1	26,5	27,0
4 a	3 Min.	6,0	14,9	20,9	28,7
4 b	mit der Hand	8,6	22,6	31,2	27,6

Während also die absoluten Zahlen der abgespaltenen Fettsäuren sich zwischen 6,0 und 14,4, die extrahierten Fettsäuren zwischen 20,9 und 53,4 ccm $^1/_{10}$-Normalnatronlauge bewegen,

schwanken die Prozente der abgespaltenen Fettsäuren dagegen nur zwischen 26,6 und 28,7.

Wie es unser Ziel war, die Dauer des Schüttelns möglichst kurz zu machen, so richteten wir auch unser Bestreben darauf, die Verseifung möglichst einfach zu gestalten und zeitlich möglichst zu beschränken. Um diesem Ziele nahe zu kommen und um Unterschiede aufzuklären, die sich zahlenmäfsig bei der Titration nach der Verseifung auch für gleiche Versuchsanordnung ergeben hatten, mufste der Vorgang der Verseifung noch näher untersucht werden. Denn es interessierte nicht nur der Einflufs der Temperatur, der Anwesenheit von Äther und Alkohol auf den zeitlichen Ablauf der Verseifung, es erwiesen sich auch das Glasgefäfs und die Kohlensäure der Luft von Einflufs auf die Resultate.

Versuchsreihe 7. (24. August 1901.)

Versuchsanordnung: In 6 Kölbchen — 4 von Jenenser, 2 von gewöhnlichem Glase — werden aus einer Bürette je 50 ccm Fettäther, d. h. Äther, mit welchem eine gröfsere Portion Eigelb ausgeschüttelt worden war, gebracht; zu allen wird 75 ccm Alkohol, zu zweien jedoch erst nach Verdampfung des Äthers, zugesetzt. Alle werden titriert und mit 5 ccm Normalkalilauge versetzt. Von den ersten 4 werden 2 nach 14, alle, eventuell nach nochmaliger Verseifung, nach 24 Stunden titriert. Die ersten 4 werden unter Kochen, die letzten 2 in der Kälte verseift.

Nr.	Art des Glases, Behandlung	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren		Durch Verseifung gewonnene Fettsäuren
			nach 14 Stunden	nach 24 Stunden	
1 a	Jenenser Glas mit Äther warm	5,8	21,8	2,1	23,9
1 b		5,8	—	24,7	24,7
2 a	Jenenser Glas ohne Äther, warm	5,8	22,2	1,7	23,9
2 b		5,8	—	22,7	22,7
3 a	Gewöhnl. Glas mit Äther, kalt	7,9	—	23,2	23,2
3b		8,1	—	25,9	25,9

Es ergiebt sich also, dafs die Anwesenheit von Äther für den Vorgang der Verseifung belanglos ist, und dafs die Verseifung in der Wärme wie in der Kälte innerhalb von 24 Stunden vollendet ist. Eine weitere Verseifung ergiebt nur noch geringe Säure-

mengen, und zwar nur, wenn man ohne Abschlufs der Kohlensäure arbeitet. Daraus geht hervor, dafs auch die Kohlensäure der Luft die Resultate dadurch beeinflufst, dafs sie von der offen stehenden alkalischen Flüssigkeit gebunden, nach Zusatz von Salzsäure nicht entweicht, wohl deshalb, weil die Flüssigkeit ja nicht salzsauer, sondern fettsauer wird.

Versuchsreihe 8. (10. Juli 1902.)

Versuchsanordnung: 50 ccm Fettäther werden mit 50 ccm Alkohol und 5 ccm Normalnatronlauge 24 Stunden lang kalt und warm, und 2 Stunden lang warm unter Kohlensäureabschlufs (Natronkalkröhrchen) verseift.

Nr.	Art der Verseifung	Dauer der Verseifung	Menge der durch Verseifung abgespaltenen Fettsäuren
1 a	kalt	24 Stdn.	33.2
1 b			31,4
2 a	warm		33,1
2b			32,1
3 a	warm	2 "	32,8
3 b			32,4

Die Zahlen beweisen nicht nur, dafs die Verseifung in der Kälte nach 24 Stunden vollendet ist, sondern auch, was wichtiger ist, dafs man sie in 2 Stunden durch Kochen der Lösung beendigen kann.

Zur Erkenntnis der Wichtigkeit des Kohlensäureabschlusses sind wir erst in der letzten Zeit gekommen. Zunächst fanden wir eine Hauptfehlerquelle, welche die Resultate trübte, im Glase. Es war uns aufgefallen, dafs im Gegensatz zu den Werten der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren, bei der II. Titration die erhaltenen Werte schlecht übereinstimmten.

Es waren bisher zur Verseifung und Titration wässerige Normallaugen gebraucht worden. Bei der Verseifung mit alkoholischen Laugen und mit metallischem Natrium blieben die Resultate gleich ungenau.

In der That stellte sich heraus, dafs das Glas der einigemal benutzten Flaschen so weit, als die alkalische Flüssigkeit darin zu stehen pflegte, trüb geworden war und an Wasser merkliche Mengen Alkali abgab.

Die Prüfung verschiedener Glasarten ergab, dafs Jenenser Normalglas relativ am beständigsten gegen Lauge ist, während Wiener Kaliglas schon an kaltes destilliertes Wasser Alkali abgiebt.

Da es uns nicht möglich war, die Versuche in Porzellan- oder Metallgefäfsen zu wiederholen, so mufsten wir darauf bedacht sein, auf andere Weise den Fehler dadurch möglichst auszuschalten, dafs das nach einem Versuche im Glase vorhandene lösungsfähige Alkali beseitigt wurde

Dies gelang zunächst durch ein etwas zeitraubendes Verfahren. Die Fläschchen wurden nämlich so lange der Einwirkung strömenden Dampfes ausgesetzt, bis das sich an den Wänden derselben kondensierende Wasser ohne Alkaligehalt abflofs. Durch die Liberalität des Herrn Geheimrat Professor Dr. Riegel, der im Anschlufs an die Dampfdruckleitung eine Vorrichtung anbringen liefs, auf der gleichzeitig drei Fläschchen der Einwirkung strömenden Dampfes ausgesetzt werden konnten, wurde es möglich, etwas rascher zu arbeiten.

Versuchsreihe 9.

Versuchsordnung: Je 50 ccm Fettäther + 75 ccm neutralen Alkohols + Phenolphtalëin werden mit 10 ccm Normalnatronlauge in gereinigten Fläschchen verschieden lange in der Wärme verseift, mit 10 ccm Normalsalzsäure versetzt und mit $^1/_{10}$-Normalnatronlauge titriert.

Nr.	Dauer der Verseifung	Menge der Fettsäuren	Nr.	Dauer der Verseifung	Menge der Fettsäuren
1a	1 Stde.	31,8	4a	$3^1/_2$ Stdn.	32,2
1b		30,9	4b		32,3
2a	$1^1/_2$ "	31,8	5a	$4^1/_4$ "	33,4
2b		31,5	5b		31,4
3a	2 Stdn.	33,3	6a	5 "	32,3
3b		32,0	6b		32,3

Aus diesen ziemlich gut übereinstimmenden Zahlen geht hervor, dafs eine Stunde auf dem Wasserbade zur Verseifung vollkommen genügt.

Zwar sind die Zahlen der Tabellen unter 1 und 2 niedriger als die folgenden; wenn man aber berücksichtigt, dafs bei längerer Verseifung erstlich das Glas entsprechend stärker von der Lauge angegriffen und zweitens um so mehr Kohlensäure aufgenommen wird, so mufs man die Zahlen unter 1 und 2 dennoch als die genaueren betrachten.

Unter Anwendung der beschriebenen Methode ist es möglich, in wenigen Stunden sich ein sicheres Urteil über die fettspaltende Wirkung irgend eines Magensaftes, und wenn vielleicht Magen-

steapsin, Pepsin und Lab in parallelen Mengen ausgeschieden werden, auch über die Fermentsekretion überhaupt zu bilden.

Das Resultat dieser der Ausbildung einer einfachen und genauen Methode gewidmeten Versuche läſst sich dahin zusammenfassen:

Für die quantitative Bestimmung der Fettspaltung, wie sie in einer begrenzten Zeit stattfindet, ist das bisherige Verfahren der Soxhletextraktion der auf Kaolin getrockneten Verdauungsgemische ungeeignet, weil während der Trocknung bei Zimmertemperatur die Fettspaltung fortschreitet. Es empfiehlt sich vielmehr, das Verdauungsgemisch mit Äther (75 ccm) und etwas Alkohol auszuschütteln, einen aliquoten Teil des Äthers, mit Alkohol (50 ccm) versetzt, gegen Phenolphtalëin mittelst wässeriger $^{1}/_{10}$-Normalnatronlauge zu titrieren. Die titrierte Flüssigkeit wird mit genau 10 ccm Normalnatronlauge entweder 2 Stunden unter dem mit Natronkalkröhrchen versehenen Rückfluſsrohr gekocht oder 24 Stunden gut verkorkt kalt stehen gelassen. Nach stattgefundener Verseifung der Neutralfette werden 10 ccm Normalnatronlauge zugesetzt und nun die Neutralfette als Fettsäuren titriert. Da durch die Verseifung das Glas angegriffen wird, so empfiehlt es sich, die Kölbchen vor dem wiederholten Gebrauch auszudämpfen.

2. Die Wirkungsweise des Magensteapsins.

Mit Hülfe der beschriebenen Methode haben wir die Fettspaltung nach verschiedenen Seiten hin verfolgt. Da sich während der folgenden Untersuchungen erst das Bedürfnis nach einer Verbesserung der Methode herausstellte, so ist bei ihnen mit Ausnahme der allerletzten Versuche noch nicht die Methode in ihrer möglichsten Vereinfachung angewandt worden; namentlich nicht mit Rücksicht auf die Dauer des Schüttelns und der Verseifung, auch nicht unter Beobachtung des Kohlensäureabschlusses. Doch beeinfluſst diese Fehlerquelle die Resultate nicht wesentlich.

Der zeitliche Ablauf der Fettspaltung.

Zweite Versuchsserie.

Versuchsreihe 10. (22. August 1901.)

Versuchsanordnung: 400 ccm Eigelblösung (12 Eigelb auf 400 aufgefüllt) werden mit 130 ccm bis zur schwachen Rotfärbung von Phenolphtalëin neutralisierten Magensaftes zusammengebracht, die eine Hälfte sofort ins Wasserbad von 40° gebracht, die andere Hälfte auf

1. Flasche.

Nr.	Dauer der Ferment-einwirkung	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1	2 Stdn.	8,1	31,7	39,8	20,4
2	4 "	10,1	29,4	39,5	25,6
3	6 "	11,5	27,1	38,6	29,8
4	8 "	12,1	22,2	34,3	35,3
5	10 "	13,3	22,1	35,4	37,6
12	24 "	20,5	20,7	41,2	49,8
13	26 "	18,0	18,5	36,5	49,3
14	28 "	19,0	17,9	36,9	51,5
15	30 "	19,4	16,0	35,4	54,8
16	32 "	19,8	15,6	35,4	55,9
17	34 "	20,3	14,6	34,9	58,2
23a	36 "	21,6	12,3	33,9	63,7
26*)	75 "	44,2	12,8	57,0	77.5

*) Der in der Flasche befindliche Rest wurde ausgeschüttelt.

2. Flasche.

Nr.	Dauer der Ferment-einwirkung	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
6	12 Stdn.	10,8	34,0	44,8	24,1
7	14 "	11,2	35,7	46,9	23,9
8	16 "	11,6	34,0	45,6	25,4
9	18 "	12,1	35,3	47,4	25,5
10	20 "	12,4	33,0	45,4	27,3
11	22 "	12,5	29,6	42,1	29,7
18	36 "	13,8	21,1	34,9	39,5
19	38 "	16,3	25,0	41,3	39,5
20	40 "	16,4	24,6	41,0	40,0
21	42 "	16,9	23,7	40,6	41,6
22	44 "	17,1	23,9	41,0	41,7
23b*)	46 "	17.5	20,4	37,9	46,2
24	48 "	18,0	—	—	—
25**)	65 "	14,9**)	12,9	27,8	53,6

*) Vgl. oben Anm. *). — **) Bei der Verseifung geht ein Teil verloren.

Eis zurückgestellt und später angesetzt. Nach je 2 Stunden werden je 20 ccm mit Pipette abgenommen, sofort in Flaschen übertragen und mit 75 ccm Äther + 2 ccm Alkohol 2 Stunden lang ausgeschüttelt. Verseifung 24 Stunden lang auf dem Wasserbad mit Normalkalilauge.

Qualitatives Ergebnis: In der ersten Flasche ist die Emulsion nach 6 Stunden zerstört, der Inhalt sieht streifig aus; nach 24 Stunden fällt eine Gasentwickelung auf, die auch in der zweiten Flasche 24 Stunden nach Beginn der Verdauung bemerkt wird (Hefegärung?). Durch diese Gasentwickelung wird die Emulsion wiederhergestellt. Der Geruch ist schon nach 24 Stunden faulig.

Wie die Tabelle (S. 305) zeigt, erfolgt die Fettspaltung nicht, wie Volhard getäuscht durch die im Kaolin fortschreitende Fermentwirkung angiebt, ruckweise, sondern entsprechend unseren Kenntnissen von anderen Fermenten kontinuierlich und durch eine regelmäfsig verlaufende Kurve ausdrückbar. Dafs aber auch die Fettspaltung in den ersten 2 Stunden ebenso wenig sprungweise abläuft, ersieht man aus folgendem Versuche.

Versuchsreihe 11. (25. August 1901.)

Versuchsanordnung: 100 ccm Eigelblösung (3 Eigelb auf 100 aufgefüllt) werden mit 50 ccm neutralisierten Magensaftes nach getrennter Vorwärmung der Verdauung unterworfen. 1 Röhrchen mit 5 ccm gekochtem Magensaft + 10 ccm Eigelblösung (8). Dauer des Schüttelns 80 Minuten, der Verseifung 24 Stunden.

Nr.	Nach Stunden	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
1	0	0,9	28,1	29,0	3,1
2	1/4	1,9	27,3	29,2	6,5
3	1/2	3,0	24,9	27,9	10,8
4	3/4	3,8	23,9	27,7	13,7
5	1	4,6	24,5	29,1	15,8
6	1 1/4	5,1	24,7	29,8	17,1
7	1 1/2	6,0	25,5	31,5	19,1
8	2 gek.	0,9	25,0	25,9	3,5

Weiteres Zahlenmaterial erbringen die Versuchsreihen 15, 16 und 17 der Serie III.

Weder im Magen noch im Reagenzglas wird das Maximum der Spaltung rasch erreicht. Die Intensität der Fettspaltung nimmt vielmehr allmählich ab. Zur Erklärung dieser Thatsache lassen sich vier Möglichkeiten heranziehen. Entweder kann die Spaltung

bei gleicher Fermentmenge abhängig sein von der vorhandenen, zu spaltenden Fettmenge und um so gröfser sein, je kleiner diese ist, oder sie wird durch Anhäufung von Verdauungsprodukten verlangsamt, oder es hat infolge der Emulsionszerstörung das Ferment eine geringere Angriffsfläche. Endlich besteht die Möglichkeit, dafs das Ferment mit der Zeit beim Stehen bei Körpertemperatur an Wirksamkeit abnimmt.

Über den Einflufs der Fettmenge auf die Gröfse der Spaltung.

Volhard hat nach Versuchen mit den früheren Methoden gefunden, dafs die gebildete Fettsäuremenge direkt proportional den angewandten Fettmengen sei, dafs also relative, in Prozenten ausdrückbare Werte für die Verdauungsprodukte resultieren. Wir haben mehrere Versuche unter Variation der Fettmengen angestellt.

Versuchsreihe 12. (14. August 1901.)

Versuchsanordnung: Doppelversuch. Je 5 ccm eines stark sauren Magensaftes werden mit abnehmenden Mengen Eigelblösung und so viel Wasser zusammengebracht, dafs das Volum in allen Versuchen gleich ist.

Verdauungszeit: 4 Stunden. Dauer des Schüttelns 5 Stunden, der Verseifung 24 Stunden.

Qualitatives Ergebnis: In 1 bis 5a und b Zerstörung der Emulsion, in 1a und b Streifen- und Flockenbildung, ebenso in 2a und b, nur befindet sich am Boden des Gläschens eine klare Molke, in der sich einige gelbe Flocken befinden, darüber schwimmt eine gelbe flockig-streifige Masse. In 3a und b ist dieser Befund noch ausgeprägter, mehr trübe Molke, weniger Bodensatz, leichte Retraktionserscheinungen. In 4a u. b schwimmt in trüber Molke ein retrahierter Cylinder; ebenso in 5a u. b.

Nr.	Versuchsanordnung			I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
	Eigelblösung ccm	Magensaft ccm	H_2O ccm				
1a	10,0	5	—	9,2	34,1	43,3	21,2
2a	7,5	5	2,5	7,6	25,85	33,45	22,7
3a	5,0	5	5,0	5,6	19,4	25,0	22,4
4a	2,5	5	7,5	2,9	(7,7)*)	(10,6)*)	(26,4)*)
5a	1,0	5	9,0	0,9	3,1	4,0	22,5
6a	—	5 } gekocht	10,0	0,2	0,1	0,3	—
7a	10,0	5 } gekocht	—	1,5	39,6	41,5	3,6

*) Vgl. Anm. S. 308.

Nr.	Versuchsanordnung			I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
	Eigelblösung ccm	Magensaft ccm	HO_2 ccm				
1b	10,0	5	—	8,9	33,5	42,4	21,0
2b	7,5	5	2,5	7,1	24,8	31,9	22,3
3b	5,0	5	5,0	5,5	17.4	22,9	24,0
4b	2,5	5	7,5	2,8	(7,8)*)	(10,6)*)	(27,3)*)
5b	1,0	5	9,0	0,85	(13.35)*)	(14,2)*)	(20,7)*)
6b	—	5 } gekocht	10,0	0,2	3,2	3.4	—
7b	10,0	5 } gekocht	—	1,6	39,1	40,7	3,9

Während es in diesem mit verhältnismäfsig geringen Mengen Eigelb angestellten Versuche den Eindruck macht, als wäre die Intensität der Fettspaltung der angewandten Fettmenge direkt proportional, so beweisen die folgenden mit gröfseren Fettmengen angestellten Versuche das Gegenteil.

Versuchsreihe 13. (16. Juli 1902.)

Versuchsanordnung: Wachsende Mengen einer Eigelblösung (13:500) werden mit Magensaft von wechselnder Fermentmenge im Wasserbade bei 40° der Verdauung unterworfen. Drei Proben (I) werden durch Wasserzusatz auf gleiches Volum gebracht, drei weitere Proben (II) behalten verschiedenes Volum, in den drei letzten (III) wird bei gleichbleibenden Ferment- und Fettmengen nur das Volum durch Wasserzusatz geändert. Nach 4 und nach 24 Stunden werden aus den Flaschen I und III, und nach 4 Stunden aus der Flasche II je 20 ccm mit Pipette abgenommen. Der verwandte Magensaft war neutralisiert. Zu II wurden 10 ccm dieses Magensaftes auf 90 ccm mit Wasser aufgefüllt, um den Einflufs der Fettmenge auf die Spaltung bei geringem Fermentgehalt zu studieren. Die Ausschüttelung erfolgte mit der Hand. Die heifse Verseifung (mit Natronkalkröhrchen) dauerte 2 Stunden.

Qualitatives Ergebnis: Nach 4 Stunden ist die Emulsion in I, 1 und 2 zerstört; in I 1 ein feiner, in I 2 ein flockiger Bodensatz, darüber eine gelbe trübe Molke. I 3 unverändert, ebenso II. In III haben sich feine Flocken ohne Abrahmung gebildet, in III 2 ist diese Erscheinung

*) Die Versuche 4a, 4b, 5b sind verunglückt; da die in 10 ccm Eigelblösung vorhandene gesamte Fettsäure 62 ccm $^1/_{10}$-Normalnatronlauge entsprach, so konnte berechnet werden, wie viel 50 ccm Fettäther von 2,5 und 1,0 ccm Eigelblösung enthielten.



eben angedeutet, III 3 ist unverändert. Nach 24 Stunden ist die Emulsion in I und III zerstört. In I 1 hat sich eine gelbe cylindrische Platte unter einer gelben trüben und über einer farblosen trüben Molke abgesetzt. In I 2 ist die Bildung noch nicht so ausgesprochen, unten eine dichtere flockige cylindrische Masse, darüber gelbe in trüber Molke schwimmende Flocken. In II 3 eine rissige gelbe Masse, ebenso in III 1 mit dem Unterschiede, dafs diese Masse unten homogener als oben ist. In III 2 schwimmt über einer gelben trüben, einige Flocken enthaltenden Flüssigkeit eine unregelmäfsig gestaltete homogene Masse, darüber gelbe Molke mit reichlichen feineren und gröberen Brocken. In III 3 schwimmen in trüber Molke grobe und feine gelbe Flocken.

Nr.	Versuchsanordnung				I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
	Eigelblösung ccm	Magensaft ccm		H_2O ccm				
			nach 4 Stunden					
I. 1 a	10	30	unverdünnt	90	1,7	1,9	3,6	46,9
2 a	50	30	unverdünnt	50	5,7	12,8	18,5	30,8
3 a	100	30	unverdünnt	—	9,0	26,6	35,6	25,3
II. 1 a	10	30	verdünnt 10:90	—	3,3	8,8	12,1	27,3
2 a	50	30	verdünnt 10:90	—	3,2	29,8	33,0	9,7
3 a	100	30	verdünnt 10:90	—	2,0	36,5	38,5	5,2
III. 1 a	50	30	unverdünnt	30	9,7	23,5	33,2	29,2
2 a	50	30	unverdünnt	80	5,3	12,4	17,7	29,9
3 a	50	30	unverdünnt	320	2,6	6,6	9,2	28,2
			nach 24 Stunden					
I. 1 b	10	30		90	2,5	1,0	3,5	71,5
2 b	50	30		50	9,8	7,7	17,5	56,0
3 b	100	30		—	17,8	22,2	40,0	44,5
III. 1 b	10	30		30	18,8	19,1	37,9	49,6
2 b	50	30		80	8,7	6,3	15,0	58,0
3 b	100	30		320	4,2	3,2	7,4	56,7

Da dieser Versuch für die zweite Hälfte nicht gänzlich einwandsfrei erschien, weil ja durch Abnehmen von 20 ccm sowohl Fett- wie auch Fermentmenge vermindert wurde, so stellten wir unter Umgehung dieser Fehlerquelle den folgenden Versuch an.

Versuchsreihe 14. (18. Juli 1902.)

Versuchsanordnung: Wachsende Mengen einer Eigelblösung (8:275) werden in Fläschchen mit gleichen Mengen neutralisierten Magensaftes und abnehmenden Mengen Wasser 3 und 24 Stunden der Verdauung im Wasserbade bei 41° unterworfen. Das Ausschütteln erfolgt in den gleichen Fläschchen mit der Hand. Dauer der Verseifung: 2 Stunden auf dem Wasserbade.

Qualitatives Ergebnis: Nach 3 Stunden zeigen sich in keinem der Verdauungsgemische makroskopische Veränderungen. Nach 24 Stunden findet sich überall Emulsionsstörung mit Abrahmung, Molken- und Cylinderbildung.

Nr.	Versuchsanordnung			I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren
	Eigelblösung ccm	Magensaft ccm	H_2O ccm				
				nach 3 Stunden			
I. 1a	10	10	10	7,7	18,3	26,0	29,6
2a	15	10	5	12,0	34,0	46,0	26,1
3a	25	10	—	13,6	42,0	55,6	24,5
II. 1a	5	10	45	9,1	5,6	14,7	62,6
2a	25	10	25	28,0	46,8	74 8	37,4
3a	50	10	—	39,0	62,1 + 4,3*)	105,4	37,0
				nach 24 Stunden			
I. 1b	10	10	10	17,8	9,1	26,9	66,2
2b	15	10	5	23,7	19,8	43,5	54,4
3b	25	10	—	28,9	24,7	53,6	53,9
II. 1b	5	10	45	2,3	0,6	2,9	79,3
2b	25	10	25	14,6	8,5	23,1	63,6
3b	50	10	—	26,7	15,2	51,9	51,4

Es zeigt sich also, dafs in Verdauungsgemischen, die dieselben Ferment- und Fettmengen enthalten, die Verdünnung für die Gröfse der Spaltung gleichgültig ist; selbst eine erhebliche Verdünnung

*) Da es sich bei II 3a gezeigt hatte, dafs der Verseifung Schwierigkeiten erwachsen, wenn die ganze Menge ausgeschüttelt und verseift wurde, werden bei II 1b ff. wieder 20 ccm als Testprobe abgehoben und ausgeschüttelt. II 3a wurde nochmals verseift und ergab nach der zweiten Verseifung noch einen Ausschlag von 4,3.



(13. III, 3 a) setzt die Fettspaltung kaum merklich herab, dagegen scheint ein Zuwenig an Wasser die Reaktion zu beeinträchtigen (14. I, 3 a, II, 2 a; I, 3 b, II, 2 b).

Bei gleicher Fermentkonzentration und ungleichen Fettmengen kommt es auf die Gröfse der Differenzen an. Differieren die Fettmengen beträchtlich, so macht sich auch ein deutlicher Unterschied derart geltend, dafs die kleineren Fettmengen in der gleichen Zeit vollständiger gespalten werden. Benutzt man jedoch als Testobjekt geringere Fettmengen, z. B. 10 bis 5 ccm einer Eigelblösung (aus 3 Eiern ad 100 Wasser), so sind wirklich die abgespaltenen Fettsäuren dem angewandten Neutralfett proportional. Für die praktische Anwendbarkeit der Fettverdauungsprobe ist das insofern sehr wichtig, als man keine konstante Testfettlösung nötig hat und es keiner quantitativen Fettbestimmung bedarf, sondern nur der Eruierung der prozentischen Fettspaltung in einem aliquoten Teil des Ätherextraktes.

Über den Einflufs der Fermentmenge auf die Gröfse der Spaltung.

Volhard hat bereits wahrscheinlich gemacht, dafs auch für das Magensteapsin das Schütz-Borissowsche Gesetz gültig ist, welches besagt, dafs sich die Verdauungsprodukte verhalten wie die Quadratwurzeln der Fermentmengen. Dieses Gesetz ($p_1 : p_2 = \sqrt{f_1} : \sqrt{f_2}$) wurde zunächst von Schütz[15]) für das Pepsin angegeben und von Borissow[16]) bestätigt, dann haben Pawlow[17]) und Walther[18]) seine Gültigkeit für die bekannten fermentativen Prozesse des Verdauungskanals nachgewiesen. Deshalb war es von besonderem Interesse, die Gültigkeit des Gesetzes auch für das Magensteapsin zu untersuchen. Unsere nach der neuen Methode gemachten Versuche beweisen besser als die früheren von Volhard in seiner Habilitationsschrift veröffentlichten die Gültigkeit des Gesetzes. Volhard[19]) hat die Ergebnisse unserer Versuche zum Teil schon im Herbst vorigen Jahres auf dem Hamburger Kongresse mitteilen können. Es erübrigt nur noch, die zahlenmäfsigen Beweise zu geben.

Dritte Versuchsserie.

Versuchsreihe 15. (29. August 1901.)

Versuchsanordnung: Wechselnde Mengen eines Magensaftes (von dem 40 ccm mit $^1/_{10}$-Normalnatronlauge neutralisiert und mit Wasser auf 80 ccm aufgefüllt sind) werden in 5 Flaschen und mit Wasser auf

das gleiche Volum gebracht. Die in die Flaschen gebrachten Magensaftmengen verhalten sich wie die Quadrate der Zahlen 1, 2, 3, 4, 5. In jede Flasche kommen 100 ccm einer Eigelblösung (25 : 640) im Wasserbade von 40° zur Verdauung. Nach 3, 6, 9, 12, 24 und 78 Stunden werden jedesmal aus jeder Flasche 20 ccm mit der Pipette abgenommen und 2 Stunden lang ausgeschüttelt. Um die unvermeidlichen Beobachtungsfehler zu reduzieren, werden die 5 für jeden Zeitabschnitt erhaltenen Werte addiert und ihre Summe im Verhältnis 1 : 2 : 3 : 4 : 5 geteilt.

Qualitatives Ergebnis: Während am 29. abends die Verdauungsgemische noch gut emulgiert und dünnflüssig waren, erschienen sie am nächsten Tage dickflüssig, der Geruch war leicht faulig, nach 48 Stunden deutlicher Geruch nach Schwefelwasserstoff.

Nr.	Versuchsanordnung			I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespalt. Fettsäuren	Summe der Fettsäuren	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren	Prozente I + II + III + IV + V geteilt wie 1 : 2 : 3 : 4 : 5
	Magensaft ccm	Eigelblösung ccm	H_2O ccm					
				nach 3 Stunden				
I	25 frisch	100	—	5,3	50,3	55,6	9,5	9,75
II	16 „	100	9	3,9	50,0	53,9	7,2	7,8
III	9 „	100	16	2,6	52,0	54,6	4,8	5,85
IV	4 „	100	21	2,0	53,0	55,0	3,6	3,9
V	1 „	100	24	1,7	51,8	53,5	3,2	1,95
VI	10 gek.	35	—	1,5	50,9	52,4	2,9	—
				nach 6 Stunden				
I	25 frisch	100	—	8,0	46,8	54,8	14,6	14,0
II	16 „	100	9	6,5	48,9	55,4	11,7	11,2
III	9 „	100	16	4,0	51,9	55,9	7,2	8,4
IV	4 „	100	21	3,3	69,5	72,8	4,5	5,6
V	1 „	100	24	1,8	53,0	54,8	3,3	2,8
				nach 9 Stunden				
I	25 frisch	100	—	9,4	46,0	55,4	17,0	17,0
II	16 „	100	9	6,4*)	33,6*)	40,0	16,0	13,6
III	9 „	100	16	5,1	50,0	55,1	9,3	10,2
IV	4 „	100	21	3,1	54,2	57,3	5,4	6,8
V	1 „	100	24	1,9	52,8	54,7	3,5	3,4

*) Im Schüttelapparate öffnete sich die Flasche, es flofs ein Teil des Äthers ab, so dafs nur noch 40 ccm abgegossen, titriert und verseift werden konnten.



Nr.	Versuchsanordnung Magensaft ccm	Eigelblösung ccm	H_2O ccm	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren	Prozente I + II + III + IV + V geteilt wie 1 : 2 : 3 : 4 : 5
				nach 12 Stunden				
I	25 frisch	100	—	10,2	40,4	50,6	20,2	18,8
II	16 „	100	9	8,6	44,4	53,0	16,2	15,0
III	9 „	100	16	6,3	55,8	62,1	10,1	11,3
IV	4 „	100	21	3,5	54.3	57,8	6,1	7,5
V	1 „	100	24	2,1	53,1	55,2	3,8	3,8
				nach 24 Stunden				
I	25 frisch	100	—	12,5	38,5	51,0	24,5	24,0
II	16 „	100	9	10,4	42,9	53,3	19,5	19,2
III	9 „	100	16	8,0	45,3	53,3	15,0	14,4
IV	4 „	100	21	4,7	50,3	55,0	8,5	9,6
V	1 „	100	24	2,6	52,4	55,0	4,7	4,8
				nach 48 Stunden				
I	25 frisch	100	—	21,1	44,5	65,6	32,1	34,1
II	16 „	100	9	17,8	45,3	63,3	28,1	27,3
III	9 „	100	16	14,7	52,0	66,7	22,8	20,55
IV	4 „	100	21	9,7	64,3	74,0	13,1	13,7
V	1 „	100	24	4,9	68,6	73,5	6,7	6,85

Weniger befriedigend, aber doch annäherungsweise finden wir das gesetzmäfsige Verhalten in einer zweiten derartigen Versuchsreihe, bei welcher die erst später eliminierten Fehlerquellen das Resultat anscheinend mehr beeinträchtigen, sie soll aber aus Billigkeitsgründen hier doch Platz finden.

Versuchsreihe 16. (6. September 1901.)

Versuchsanordnung: Neutralisierter Magensaft wird unverdünnt verwandt. Die Anordnung sonst wie bei Versuchsreihe 15. Verdauungszeit 3, 6, 9, 12, 24, 48 und 72 Stunden. Dauer des Schüttelns 1 Stunde, der Verseifung 6 Stunden.

Qualitatives Ergebnis: Die Emulsion ist um so eher zerstört, je mehr Magensaft zu den betreffenden Versuchen verwandt worden ist, derart, dafs sich nach 6 Stunden in Flasche I Rifsbildung, nach 9 Stunden vollkommene Zerstörung der Emulsion mit Abrahmung und in Flasche II Rifsbildung zeigt. In III treten Emulsionszerstörungen erst nach 24 Stunden auf, ohne dafs es zu Abrahmung käme. In Flasche IV und V sind keine makroskopischen Veränderungen zu beobachten.

Nr.	Versuchsanordnung			I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren	Prozente I + II + III + IV + V geteilt wie 1 : 2 : 3 : 4 : 5
	Magensaft ccm	Eigelblösung ccm	H_2O ccm					
				nach 3 Stunden				
I	25	125	—	9,6	45,8	55,4	17,3	17,7
II	16	125	9	9,4	48,1	57,5	16,3	14,2
III	9	125	16	6,9	60,3	67,2	10,3	10,6
IV	4	125	21	3,9	63,0	66,9	5,8	7,1
V	1	125	24	2,3	62,6	64,9	3,5	3,5
				nach 6 Stunden				
I	25	125	—	11,7	45,3	57,0	20,5	22,7
II	16	125	9	11,6	41,9	53,5	21,7	18,1
III	9	125	16	9,1	54,5	63,6	14,3	13,6
IV	4	125	21	5,5	68,4	73,9	7,4	9,1
V	1	125	24	2,7	62,7	65,4	4,1	4,5
				nach 9 Stunden				
I	25	125	—	13,1	41,5	54,6	24,0	25,5
II	16	125	9	13,4	43,7	57,1	23,5	20,4
III	9	125	16	10,9	55,5	66,4	16,4	15,3
IV	4	125	21	6,5	68,3	74,8	8,7	10,2
V	1	125	24	2,8	71,3	74,1	3,8	5,1
				nach 12 Stunden				
I	25	125	—	14,2	38,3	52,5	27,0	29,0
II	16	125	9	15,2	42,7	57,9	26,2	23,2
III	9	125	16	11,7	51,5	63,2	18,5	17,4
IV	4	125	21	7,1*)	60,6*)	67,7	10,5	11,6
V	1	125	24	1,7	34,0	35,7	4,8	5,8

*) Beim Aufsetzen auf das Verseifungsbad fiel die Flasche um, ein Teil floſs aus, 42 ccm blieben übrig; 142 ccm waren anfänglich im Fläschchen (50 Fettäther + 75 Alkohol + 7,1 $^1/_{10}$-Normalnatronlauge + 10 Normalnatronlauge), also 142,1 : 10 = 42 : x; x = 3,0, d. h. es sind 3 ccm Normalsalzsäure zur Spaltung der gebildeten Seifen und zur Neutralisation des überschüssigen Alkalis nötig. Die Menge der vorhandenen ungespaltenen Fette berechnet sich demnach als Fettsäure nach der Formel 142,1 : 42 = y : 17,9; y = 60,6.

Nr.	Versuchsanordnung Magen-saft ccm	Eigelb-lösung ccm	H_2O ccm	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abspaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren	Prozente I + II + III + IV + V geteilt wie 1:2:3:4:5
				nach 24 Stunden				
I	25	125	—	18,7	34,1	52,8	35,4	37,0
II	16	125	9	17,8	37,7	55,5	32,1	29,6
III	9	125	16	15,3	50,4	65,7	23,3	22,2
IV	4	125	21	9,1	58,5	67,6	13,5	14,8
V	1	125	24	2,3	32,6	34,9	6,6	7,4
				nach 48 Stunden				
I	25	125	—	24,9	31,6	56,5	44,1	46,1
II	16	125	9	23,4	33,4	56,8	41.2	36,9
III	9	125	16	18,9	45,0	63,9	29,6	27,7
IV	4	125	21	12,0	58,4	70,4	17,0	18,4
V	1	125	24	4,5	65,8	70,3	6,4	9,2
				nach 72 Stunden				
I	25	125	—	27,8	28,9	56.7	49,0	50,4
II	16	125	9	25,7	33,8	59,5	43,2	40,3
III	9	125	16	19,4	41,3	60,7	32,0	30,2
IV	4	125	21	13,2	52,5	65,7	20,0	20,2
V	1	125	24	4,7	63,3	68,0	6,9	10,1
				Kontrolle				
10 Magensaft gekocht + 10 ccm Eigelblösung nach 3 Stunden				1,6	38,3	39,9	4,0	—

Sehr bald läfst die Schützsche Regel in der folgenden Versuchsreihe im Stich, in welcher höhere Fermentkonzentrationen in Anwendung kamen.

Versuchsreihe 17. (21. Juli 1902.)

Je 1. 4, 9, 16, 25 ccm eines neutralisierten normalen Magensaftes werden durch 1, 4, 9, 16 und 25 Stunden mit 10 ccm einer Eigelblösung (8: 175) im Wasserbad (40°) digeriert. Die Verdauungsgemische werden direkt in 100 bis 150 ccm haltenden Schüttelflaschen ins Wasserbad gebracht, nach Ablauf der Verdauungszeit in Eis gekühlt, mit 75 ccm Äther + 2 ccm Alkohol übergossen und mit der Hand ausgeschüttelt. Dauer der Verseifung 2 Stunden unter Kohlensäureabschlufs.

Qualitatives Ergebnis: Emulsionszerstörungen waren erst nach 9 Stunden zu beobachten. Sie bestanden in Flockenbildung, während sich nach 16 und 25 Stunden Cylinderbildung ergab.

Nr.	Versuchsanordnung Magensaft ccm	Versuchsanordnung Eigelblösung ccm	I. Titration: durch Ferment abgespaltene Fettsäuren	II. Titration: durch Verseifung abgespaltene Fettsäuren	Summe der Fettsäuren in 50 ccm Äther	Prozente der durch Ferment abgespaltenen Fettsäuren	Prozente I + II + III + IV + V geteilt wie 1:2:3:4:5
			nach 1 Stunde				
1 a	25	10	6,2	20,1	26,3	(23,6)	—
2 a	16	10	5,4	20,0	25,4	21,3	21,6
3 a	9	10	4,3	20,7	25,0	17,3	16,2
4 a	4	10	2,9	23,1	26,0	11,2	10,8
5 a	1	10	1,0	23,4	24,4	4,1	5,4
			nach 4 Stunden				
1 b	25	10	7,9	9,5	17,4	(45,4)	—
2 b	16	10	9,4	12,0	21,4	(44,0)	48,0
3 b	9	10	9,7	17,8	27,5	38,9	37,5
4 b	4	10	7,3	18,8	26,1	28,0	25,0
5 b	1	10	3,7	23,4	27,1	13,7	12,5
			nach 9 Stunden				
1 c	25	10	8,8	5,1	13,9	(63,3)	—
2 c	16	10	9,0	8,0	17,0	(52,9)	—
3 c	9	10	11,6	11,9	23,5	49,4	—
4 c	4	10	12,2	18,4	30,6	39,8	39,2
5 c	1	10	5,6	23,5	29,1	19,2	19,6
			nach 16 Stunden				
1 d	25	10	14,7	6,8	21,5	(68,4)	—
2 d	16	10	9,5	4,6	14,1	(67,4)	—
3 d	9	10	6,0	5,8	11,8	(50,9)	—
4 d	4	10	9,6	14,0	23,6	40,7	41,6
5 d	1	10	5,5	19,7	25,2	21,6	20,8
			nach 25 Stunden				
1 e	25	10	12,6	4,4	17,0	(74,1)	—
2 e	16	10	12,3	4,4	16,7	73,6	—
3 e	9	10	12,0	6,3	18,3	65,6	—
4 e	4	10	13,7	16,1	29,8	46,0	—
5 e	1	10	8,1	17,6	25,7	31,5	—

Diese Versuchsreihe zeigt, dafs das gesetzmäfsige Verhalten mit Zunahme der Verdauungsprodukte eine Grenze hat, und zwar hört es bei höheren Fermentkonzentrationen an sich und bei den weniger konzentrierten im Laufe längerer Verdauungszeit auf. Dabei stellt sich heraus, dafs mit steigenden Fermentkonzentrationen und mit Zunahme der Verdauungsprodukte die Übereinstimmung mit dem Gesetz immer schlechter wird.

Mit diesem Verhalten steht das fettspaltende Ferment nicht allein in der Reihe der Fermente. Auch beim Pepsin beobachtet man, dafs es in höheren Konzentrationsgraden dem Schütz-Borissowschen Gesetze nicht mehr folgt.

Trägt man, wie es Volhard bei seinem Hamburger Vortrag gethan hat, die erhaltenen Werte mit den Verdauungsprodukten als Ordinaten der Zeit als Abscisse auf, so ergiebt sich an der resultierenden Kurve auch der schöne und regelmäfsige Verlauf der Fermentwirkung. Ist dieser ein gesetzmäfsiger, so müssen alle mit irgend einem beliebigen Magensafte gewonnenen Fermentationskurven mit den aufgezeichneten in ihrem Verlaufe übereinstimmen. Unterscheiden dürfen sie sich nur durch die Gröfse ihrer Ordinaten. Doch mufs das Verhältnis zweier Ordinaten auf derselben Zeitabscisse für je zwei Kurven überall gleich und konstant sein ($p_1 : p_2 =$ konst.).

Will man die gefundenen Resultate in die Praxis übertragen, so steht man vor zwei Möglichkeiten. Entweder man berechnet aus den für zahlreiche Magensäfte gefundenen Werten eine Normalkurve, oder man legt beim Vergleiche irgend eine gefundene Kurve zu Grunde. Das letztere erscheint zunächst, wo vergleichende Untersuchungen einer grofsen Anzahl normaler Magensäfte hinsichtlich ihrer fettspaltenden Wirkung noch nicht gemacht sind, als das Einfachere und Praktischere. Betrachtet man die unterste der von Volhard veröffentlichten Kurven als das Bild der Wirksamkeit der Fermenteinheit, so verhalten sich die Ordinaten der folgenden zu dieser wie 1:2:3:4:5; es entspricht die zweite 4, die dritte 9, die vierte 16, die fünfte 25 Fermenteinheiten. Diese müfsten in derselben Zeit wie die Fermenteinheit 2-, 3-, 4- und 5 mal soviel Fett spalten. Es würden also 25 Fermenteinheiten nicht 25 mal, sondern in derselben Zeitdauer 5 mal so viel Fett spalten als die Einheit; mit anderen Worten: man müfste, um 10 mal so viel Fett als die Fermenteinheit in der gleichen Zeit zu spalten, 100 Fermenteinheiten zur Wirksamkeit bringen.

Dafs die von Volhard aufgezeichneten Kurven ein Bild der

Fermentwirkung geben, dafs jede andere Fermentationskurve des Magensteapsins gleichstimmig mit ihnen verläuft, das beweisen die mit den Zahlen der Versuchsreihe 10 gewonnenen Kurven.

Das Verhältnis ihrer Ordinaten zu den auf derselben Zeitabscisse gelegenen der Einheitskurve ist überall ungefähr gleich und beträgt für Versuch I 10,3 bis 10,6, für Versuch II 6,3 bis 6,8. Der zu Versuch I verwandte Magensaft enthält also $10{,}3^2$ bis $10{,}6^2$, der zu Versuch II verwandte, dessen Wirksamkeit durch Stehen abgenommen hatte, $6{,}3^2$ bis $6{,}8^2$ mal mehr Ferment als der, mit dem die Einheitskurve erhalten wurde; d. h. er enthält 106 bis 110, bezw. 39 bis 43 Fermenteinheiten. Und wenn wir nach dem ersten gut stimmenden Versuche auch für die letzte Versuchsreihe die Fermentmengen berechnen, so hätte 1 ccm dieses Saftes etwa $5{,}8^2$ oder 33,64 und 25 ccm hätten etwa $(5 . 5{,}8)^2$, d. h. 841 Fermenteinheiten enthalten.

Es ergiebt sich aber aus den Zahlen unserer Versuche nicht nur eine Bestätigung des Schütz-Borissowschen Gesetzes, das für verschiedene Fermentmengen bei gleichen Zeiten gilt, sondern auch ein Gesetz, gültig für gleiche Fermentmengen, für denselben Magensaft zu verschiedenen Zeiten, ein neues Zeitgesetz für das fettspaltende Ferment.

Wir haben aus den früheren Versuchen ersehen, dafs die Spaltung in einem gewissen Verhältnis zur Zeit steht.

Die Natur dieser Proportionalität giebt sich erst deutlich zu erkennen an der Reihe 5a bis f der Versuchsreihe 15, an der mit dem schwächsten Fermentgehalt erhaltenen Verdauungskurve. Hier heifst die nach Schütz-Borissow berechnete Idealkurve

	1.95	2,8	3,4	3,8	4,8	6,85 Proz.
nach	3	6	9	12	24	48 Stunden

und es fällt auf, dafs diese Kurve zufällig fast identisch ist mit den Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten:

1,7 2,5 3,0 3,5 4,9 6,9.

Der Faktor, um den sich die Wurzeln der Verdauungszeiten von den Verdauungsprodukten unterscheiden, beträgt annähernd 1 und ist fast konstant.

In Formel gebracht, lautet das neue Gesetz $p : p_1 : p_2 = \sqrt{t} : \sqrt{t_1} : \sqrt{t_2}$ oder $p = x \sqrt{t}$. Der Faktor x zerfällt nach dem Gesetz von Schütz-Borissow in den Ausdruck $k \sqrt{f}$, und wir erhalten allgemein die Formel $p = k \sqrt{ft}$.

Wählen wir als Fermenteinheit den Fall, in welchem $k = 1$, die Verdauungsprodukte also direkt den Wurzeln aus den Ver-

dauungszeiten gleich sind, also für 1 Stunde 1 Proz., für 2 Stunden $\sqrt{2}$ Proz., für 4 Stunden 2 Proz., für 9 Stunden 3 Proz. Fettsäure betragen, so erhalten wir die Formel $p = \sqrt{ft}$; f also $= \frac{p^2}{t}$, mit anderen Worten: wir brauchen nur das Quadrat der zu einer beliebigen Zeit erhaltenen prozentischen Verdauungsprodukte durch die Verdauungszeit zu dividieren, um zu wissen, wieviel Fermenteinheiten die angewandte Probe Magensaft enthält.

Machen wir für sämtliche Verdauungsversuche der Reihe 15 die Probe, indem wir die Verdauungsprodukte durch $\sqrt{ft}$ dividieren, so mufs aus allen derselbe konstante Faktor resultieren.

p	f	t	k
9,5 :	5 ×	1,7 =	1,12
7,2 :	4 ×	1,7 =	1,06
4,8 :	3 ×	1,7 =	1,06
3,6 :	2 ×	1,7 =	1,06
3,2 :	1 ×	1,7 =	(1,8)

p	f	t	k
14,6 :	5 ×	2,5 =	1,17
11,7 :	4 ×	2,5 =	1,17
7,2 :	3 ×	2,5 =	0,96
4,5 :	2 ×	2,5 =	0,9
3,3 :	1 ×	2,5 =	(1,32)

p	f	t	k
17,0 :	5 ×	3 =	1,13
6,0 :	4 ×	3 =	1,33
9,3 :	3 ×	3 =	1,03
5,4 :	2 ×	2 =	0,90
3,5 :	1 ×	2 =	1,17

p	f	t	k
20,2 :	5 ×	3,5 =	1,15
16,2 :	4 ×	3,5 =	1,15
10,1 :	3 ×	3,5 =	0,96
6,1 :	2 ×	3,5 =	0,87
3,8 :	1 ×	3,5 =	1,09

p	f	t	k
24,5 :	5 ×	4,9 =	1,0
19,5 :	4 ×	4,9 =	1,0
15,0 :	3 ×	4,9 =	1,02
8,5 :	2 ×	4,9 =	0,87
4,7 :	1 ×	4,9 =	0,96

Die Übereinstimmung ist bei Berücksichtigung der Fehlerquellen doch eine überraschend gute. Wir finden also für k bei der angewandten Fermentkonzentration den Wert 1,1. Wollen wir die Fermentkonzentration in Fermenteinheiten ausdrücken, so ist $p = \sqrt{ft}$, in einer Stunde $p = \sqrt{f}$, $1{,}1 = \sqrt{f}$, $f = 1{,}1^2 = 1{,}2$ Fermenteinheiten. Bei Versuchsreihe 17, bei welcher der leichteren Übersicht wegen das Verhältnis der Fermentmengen sowohl wie der Verdauungszeiten den Quadraten der Zahlen 1 bis 5 entsprechend gewählt worden waren, ist leider die Übereinstimmung mit dem Gesetz nicht mehr sehr erfreulich. Doch hört auch bei dem Pepsin bei vorgeschrittener Verdauung und einer gewissen Fermentkonzentration die Gesetzmäfsigkeit auf[21]). In Versuchsreihe 16 ist der Faktor k in der nach Schütz-Borissow berechneten Idealkurve

nach 3 Stunden 2, nach 6 Stunden 1,8, nach 9 und 12 Stunden 1,7, nach 24 Stunden 1,5, nach 48 Stunden 1,3, nach 72 Stunden 1,2.

Dieses neue für das Magensteapsin abgeleitete und bewiesene Gesetz findet ein interessantes Analogon in der von Huppert und Schütz[20]) konstatierten Thatsache, dafs sich bei der Pepsinverdauung die sekundären Albumosen verhalten direkt proportional der Albuminmenge und proportional den Wurzeln aus den Fermentmengen, der Verdauungszeit und der HCl-Konzentration. $S = k\,A\,.\sqrt{p\,t\,s}$, wobei S die sekundären Albumosen, k die Geschwindigkeitskonstante, p die Pepsinmengen und s die Säuremengen bezeichnen

Bis auf den Einflufs der Säure, welche bei unserem Ferment zunächst nicht in Betracht kommt, höchstens hindernd bei höheren Konzentrationen, ist die Huppert-Schützsche Formel für das Pepsin vollständig identisch mit unserer Formel für das fettspaltende Ferment. Denn da wir in der Formel $p = k\sqrt{ft}$ unter p die prozentischen Verdauungsprodukte verstehen, so sind diese gleich den absoluten Mengen abgespaltener Fettsäuren mal $\frac{100}{F}$, wobei F die angewandten Fettmengen bedeutet, und wir erhalten die Formel $\frac{v\,.\,100}{F} = k\sqrt{ft}$ oder $v = \frac{F}{100}\,k\,.\sqrt{ft}$. Auch hier zeigt sich also das schöne parallele Verhalten des Pepsins und Magensteapsins.

Nach allem, was wir über die Sekretion des Magensaftes wissen, dürfen wir annehmen, dafs der gesunde Magen relativ gleich viel Pepsin, Lab und Steapsin abscheiden wird. Wenn die in dieser Hinsicht noch anzustellenden experimentellen Versuche zu einem positiven Resultate führen, so wird es möglich sein, für klinische Zwecke an Stelle der Pepsinbestimmungsmethoden die einfache und genaue Bestimmung der fettspaltenden Wirksamkeit eines Magensaftes treten zu lassen.

Und zwar sind wir mit der neuen Methode in der Lage, durch einfache Titration und Verseifung eines beliebigen Teiles des Ätherextrakts der Verdauungsmischung bei beliebiger Verdauungszeit den Gehalt des Magensaftes an Fermenteinheiten zahlenmäfsig auszudrücken.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Privatdozenten Dr. Volhard für die liebenswürdige Überlassung des Themas, die mannigfache Unterstützung und Förderung meiner Arbeit

durch Rat und That aufrichtig zu danken. Gleichen Dank aber schulde ich auch meinem hochverehrten Lehrer Herrn Geheimrat Professor Dr. Riegel für die Erlaubnis, diese Arbeit in seinem Laboratorium ausführen zu dürfen, sowie für die grofse Bereitwilligkeit, mit der er mir nicht nur die Materialien und Apparate des Laboratoriums zur Verfügung stellte, sondern auch für meine Arbeit wichtige Anschaffungen machte.

Litteratur:

1) Marcet, The med. Times and Gazette. New Series 1858, vol. XVIII, pag. 210.

2) Cash, Du Bois' Archiv 1880, S. 323.

3) Ogata, daselbst 1881, S. 115.

4) Müller, Zeitschrift für klinische Medizin 11, 107.

5) Klemperer und Scheuerlen, daselbst 15, 370.

6) Klug, Ungar. Archiv. für Med. 3, 87 Ref. Centralblatt f. Physiol. 1895, 9, 182.

7) Contejean, Archives de physiologie 1894, p. 125, Ref. Virchows Jahresberichte 1894, I, S. 1883.

8) Vaughan Harley, The british medical journal 1897, I, p. 1218, Ref. Virchows Jahresberichte 1897, I, S. 154.

9) v. Mering, Verhandlungen des Kongresses für innere Med. 1897.

10) Volhard, Münchener med. Wochenschrift 1900, Nr. 5 und 6.

11) Volhard, Zeitschrift für klin. Medizin 1901, Bd. 42, Heft 5 und 6.

12) Volhard, daselbst Bd. 43, Heft 5 und 6.

13) Dormeyer, Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie 61, 341; 65, 90.

14) Volhard, Verhandlungen der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte 1901, Bd. 73, Hamburg.

15) E. Schütz, Zeitschrift f. physiol. Chemie 9, 577 (1885).

16) Borissow: Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, S. 32; übers. v. Walther, Wiesbaden 1898, J. F. Bergmann.

17) Pawlow, l. c.

18) Walther, Archives des sciences biologiques publiées par l'Institut Impérial de médecine expérimentale à St. Pétersbourg, t. VII, p. 1.

19) Volhard, Verhandlungen des 19. Kongresses für innere Medizin in Berlin 1901, Wiesbaden, J. F. Bergmann.

20) Huppert und Schütz, Über einige quantitative Verhältnisse bei der Pepsinverdauung. Pflügers Archiv f. d. ges. Physiologie, 80, 1900.

21) J. Schütz, Zur Kenntnis der quantitativen Pepsinwirkung. Zeitschr. f. physiol. Chemie 30, 1 (1900).

XV.

Über den Einfluſs der Bakterien auf die Zersetzung der Knochensubstanz.

Von Prof. Dr. **Julius Stoklasa.**

Unter Mitwirkung der Assistenten **F. Ducháček** und **J. Pitra.**

(Aus dem pflanzenphysiologischen Laboratorium der k. k. böhm. techn. Hochschule in Prag.)

Die Zersetzung der Knochensubstanz durch die Bakterien ist insofern von Interesse, als man aus derselben nicht nur den Chemismus ersieht, welcher bei der Zersetzung des Osseins (des Kollagens des Knochens) gegeben ist, sondern auch das ganz abweichende Verhalten gewisser Bakterien bei der Zersetzungsarbeit verfolgen kann.

Ich habe zwar schon in einer im Zentralblatt für Bakteriologie II, 1900 erschienenen Arbeit auf diese interessanten Vorgänge aufmerksam gemacht, habe aber diese Studien in der letzten Zeit aus mehrfachen Gründen fortgesetzt. In der oben genannten Abhandlung habe ich nur über das Verhalten von 6 Bakterienarten berichtet.

Bei der Fortsetzung unserer Studien dehnten wir nunmehr die Untersuchung auf insgesamt 13 Bakterienarten aus. Als eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit betrachte ich, daſs es uns gelungen ist, festzustellen, daſs im Boden verschiedene Gruppen von Bakterienarten existieren, welche sich durch einen spezifischen Einfluſs auf die Zersetzung der Knochensubstanz charakterisieren.

Die Infektionsversuche wurden, wie früher, in einer geräumigen Brutkammer ausgeführt, und zwar wieder bei einer Temperatur von 28 bis 32° C. Hierbei ist zu bemerken, daſs jede Einwir-

kung des Tageslichtes in der Brutkammer vollständig ausgeschlossen war.

Zur Verwendung kamen folgende Mikrobenspezies: 1. Bacillus megaterium, 2. Bacillus proteus vulgaris, 3. Bacillus butyricus Hueppe, 4. Bacillus mycoides, 5. Bacillus mesentericus vulgatus, 6. Bacillus subtilis, 7. Bacterium coli commune, 8. Bacillus typhi abdominalis; ferner nachfolgende Bakterien, welche als Denitrifikationsbakterien bekannt sind und in geeigneten Nährmedien Nitratgärung hervorrufen: Bacillus fluorescens liquefaciens, Bacterium pyocyaneum, Bacterium Hartlebii, Bacterium Stutzeri, Bacterium filefaciens.

In einen 2300 ccm fassenden Kolben wurden 10 g fein durchgesiebten Knochenmehles gebracht und diesem 100 ccm Nährstofflösung und 800 ccm Wasser zugesetzt.

Die Nährstofflösung war folgendermaſsen bereitet: 1000 ccm Lösung enthielten in destilliertem Wasser:

1,0 g Kaliumsulfat,
0,5 „ Magnesiumchlorid und
0,1 „ Eisensulfat.

Das feingemahlene Knochenmehl enthielt:

19,8 Proz. Phosphorsäure,
5,26 „ Stickstoff,
1,5 „ Fett.

Auf diese Weise wurden im ganzen 20 Kolben beschickt. Hiervon wurden nach gründlicher Sterilisierung und nach Ablauf des Inkubationsstadiums, welches im ganzen 20 Tage währte, 18 Kolben mit absolut reinen Kulturen infiziert*).

Ein Teil der Kolben wurde mit Vorlagen verbunden, in welchen sich Normalschwefelsäure befand. Durch den ganzen Apparat wurde in groſsen Intervallen keimfreie Luft getrieben.

Die Anordnung der Apparate ist aus folgender Schilderung ersichtlich.

Der Erlenmeyersche Kolben mit dem Nährsubstrat ist auf beiden Seiten mit doppelten Kugelapparaten verbunden, von welchen ein Teil mit Schwefelsäure gefüllt ist. Ein kleiner Kolben, welcher sich mit dem groſsen Kolben in direkter Verbindung befindet, ist zwischen beide Kugelapparate eingeschaltet und enthält die Normalschwefelsäure. An

*) Es sei hier bemerkt, daſs mit allen Bakterienkulturen zuerst Lösungen von Pepton + Glykose bei Gegenwart aller anorganischen Nährstoffe infiziert wurden und daſs erst mit Hülfe dieser einheitlichen Nährstofflösung die Infektion der Knochenmehl enthaltenden Lösungen in den oben erwähnten Kolben vorgenommen wurde.

beiden Enden des Apparates befinden sich zwei mit sterilisierter Baumwolle gefüllte Cylinder*).

Der ganze Apparat wurde sterilisiert; die Einwirkung der Mikroben auf das Knochenmehl dauerte von der Infektion an im ganzen 33 Tage bei einer Temperatur von 32° C.

Bei der Analyse des Inhaltes einzelner infizierter Kolben, die einfach mit sterilisierter Baumwolle verschlossen waren, und durch welche Luft nicht durchgetrieben wurde, konstatierten wir eine vollkommene Übereinstimmung der Stickstoffmenge in der Amid- und Diaminoform (s. weiter unten), weshalb wir von der weiteren Analyse dieser Serie Abstand nahmen und unsere Aufmerksamkeit lediglich den mittels der oben beschriebenen Apparate ausgeführten Versuchen zuwendeten. Die Resultate der Versuche beziehen sich nur auf diejenigen Kolben, in denen wir nach Beendigung die betreffenden Mikrobenarten in Reinkultur nachgewiesen haben.

1. Verhalten des Stickstoffes.

Zur Bestimmung des Stickstoffes habe ich eine Methode angewendet, welche, auf den Erfahrungen Hlasiwetz' und Habermanns**), Cohns***) und Nasses†) über den Charakter der Eiweifskörper fufsend, im Laboratorium F. Hofmeisters von Walter Hausmann††) ausgearbeitet wurde.

Um einen gewissen orientierenden Einblick in die Bindungsweise des Stickstoffes in den tierischen Proteinkörpern zu erhalten, bestimmt der genannte Autor nach der Zersetzung mittels Salzsäure nebst dem Gesamtstickstoff 1. den in Form von Ammoniak abgespaltenen Stickstoff, 2. den Stickstoff basischer, durch Phosphorwolframsäure fällbarer Verbindungen (Lysin, Arginin, Histidin u. s. w.), 3. den fest gebundenen, zu den basischen Zersetzungsprodukten nicht gehörigen Stickstoff (Leucin, Tyrosin, Asparaginsäure, Glutaminsäure u. s. w.). Der Kürze halber nennt Hausmann die erste Stickstoffform Amidstickstoff, die zweite Form Diaminostickstoff und die dritte Monaminostickstoff.

*) Ich verweise hier auf die Illustration der Zusammenstellung meiner Apparate in der Publikation meiner Arbeit „Über den Einflufs der Bakterien auf die Knochenzersetzung" im Zentralbl. f. Bakteriol. 1890.

**) Annal. d. Chem. u. Pharm. 169.

***) Rud. Cohn, Über eine quantitative Eiweifsspaltung durch Salzsäure. Zeitschr. f. physiol. Chem. 22 und 26.

†) Pflügers Arch. 6 und 7.

††) Über die Verteilung des Stickstoffes im Eiweifsmolekül (Zeitschr. für physiol. Chem. 27 und 29).

Diese Methode ermöglicht eine interessante Übersicht über die Verteilung des Stickstoffes in den einzelnen Eiweiſskörpern. Man sieht z. B., daſs der Amidstickstoff vertreten ist im Edestin mit 10,25 Proz., im Globin nur mit 4,62 Proz., der Diaminostickstoff im Edestin mit 38,15 Proz. und im Globin mit 29,37 Proz., schlieſslich der Monaminostickstoff im Edestin mit 54,99 Proz. und im Globin mit 67,08 Proz.

Bei der Bestimmung des Stickstoffes haben wir folgenden Vorgang beobachtet:

Vom klaren Filtrate wurden 250 bis 500 ccm abgemessen und in einem Apparate, welchen man bei der Bestimmung des Stickstoffes in Ammonsalzen zu verwenden pflegt, auf etwa 100 ccm abgedampft.

Das entweichende Ammoniak wurde in der Vorlage mit Normalschwefelsäure aufgefangen. Nach gehöriger Abkühlung wurden 20 ccm konzentrierter Salzsäure zugesetzt und ein doppelt durchbohrter Stöpsel aufgesetzt, durch dessen eine Öffnung ein bis auf den Boden reichender, mit Glashahn versehener Tropftrichter ging, während die zweite Öffnung mit einem Liebigschen Kühler verbunden war. Die Kochdauer betrug 5 Stunden, die abdestillierte Flüssigkeit wurde durch den Trichter immer von neuem in den Kolben zurückgebracht.

Nach gehöriger Abkühlung und sorgfältiger Neutralisation mit gebrannter Magnesia bei stetiger Abkühlung wurde endlich das Ammoniak aus dem Chlorammonium durch Magnesiumoxyd ausgetrieben.

Nach beendeter Destillation wurde der Rückstand in Salzsäure gelöst, die Lösung auf ein kleines Volumen abgedampft und mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag nach 24 bis 30 Stunden abfiltriert und mit stark verdünnter, salzsäurehaltiger Phosphorwolframsäurelösung gewaschen, bis das Filtrat nicht mehr gelb gefärbt ablief. Der Niederschlag wurde sodann samt dem Filter in einen Kolben gebracht und der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt.

Das Filtrat wurde auf 250 ccm eingedampft und der Stickstoff entweder in dem Gesamtfiltrate oder in der Hälfte desselben ebenfalls nach Kjeldahl bestimmt. Der abdestillierte Stickstoff wurde zu jenem Stickstoff hinzuaddiert, den man mit Hülfe der gebrannten Magnesia nach dem Kochen mit Salzsäure erhalten hatte.

In einem anderen abgemessenen Teile der ursprünglichen Lösung, und zwar in 250 ccm, wurde endlich nach entsprechender Konzentration die Bestimmung des Gesamtstickstoffes ebenfalls nach Kjeldahl durchgeführt.

Alle Analysenergebnisse wurden auf 1000 ccm Flüssigkeit, somit auf 10 g Knochenmehl umgerechnet.

A. Nicht infiziertes Knochenmehl.

Amidstickstoff	0,016 g	im ganzen 0,349 g N
Diaminostickstoff	0,106 „	
Monaminostickstoff	0,227 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,369 g	

B. Infiziertes Knochenmehl.

I. Gruppe: Ammonisationsbakterien.

1. Bacillus megaterium.

Amidstickstoff	0,304 g	im ganzen 0,476 g N
Diaminostickstoff	0,102 „	
Monaminostickstoff	0,070 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,498 g	

2. Bacillus proteus vulgaris.

Amidstickstoff	0,200 g	im ganzen 0,467 g N
Diaminostickstoff	0,136 „	
Monaminostickstoff	0,131 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,459 g	

3. Bacillus butyricus Hueppe.

Amidstickstoff	0,232 g	im ganzen 0,485 g N
Diaminostickstoff	0,073 „	
Monaminostickstoff	0,180 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,506 g	

4. Bacillus mycoides.

Amidstickstoff	0,317 g	im ganzen 0,489 g N
Diaminostickstoff	0,044 „	
Monaminostickstoff	0,128 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,510 g	

5. Bacillus mesentericus vulgatus.

Amidstickstoff	0,300 g	im ganzen 0,495 g N
Diaminostickstoff	0,195 „	
Monaminostickstoff wurde nicht bestimmt.		
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,476 g	

6. Bacillus subtilis.

Amidstickstoff	0,306 g	im ganzen 0,459 g N
Diaminostickstoff	0,091 „	
Monaminostickstoff	0,062 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,497 g	

7. Bacterium coli commune.

Amidstickstoff	0,245 g	im ganzen 0,436 g N
Diaminostickstoff	0,098 „	
Monaminostickstoff	0,093 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,465 „	

8. Bacillus typhi abdominalis.

Amidstickstoff	0,323 g	im ganzen 0,457 g N
Diaminostickstoff	0,048 „	
Monaminostickstoff	0,086 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,480 g	

II. Gruppe: Denitrifikationsbakterien.

1. Bacillus fluorescens liquefaciens.

Amidstickstoff	0,113 g	im ganzen 0,474 g N
Diaminostickstoff	0,284 „	
Monaminostickstoff	0,077 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,500 g	

2. Bacterium pyocyaneum.

Amidstickstoff	0,100 g	im ganzen 0,433 g N
Diaminostickstoff	0,253 „	
Monaminostickstoff	0,080 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,458 g	

3. Bacterium Hartlebii.

Amidstickstoff	0,082 g	im ganzen 0,456 g N.
Diaminostickstoff	0,276 „	
Monaminostickstoff	0,098 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,420 g	

4. Bacterium Stutzeri.

Amidstickstoff	0,051 g	im ganzen 0,351 g N
Diaminostickstoff	0,206 „	
Monaminostickstoff	0,094 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,362 g	

5. Bacterium filefaciens.

Amidstickstoff	0,038 g	im ganzen 0,322 g N
Diaminostickstoff	0,221 „	
Monaminostickstoff	0,063 „	
Gesamtstickstoff in der Lösung	0,351 g	

Aus den angeführten Daten sind die bedeutenden Unterschiede in der Verteilung des Stickstoffes im Knochenmehlextrakte, je nach der Art der wirksam gewesenen Mikroben, ersichtlich*). Allerdings kommen ziemlich auffallende Differenzen zwischen der Summe der einzelnen bestimmten Stickstofffraktionen und dem Gesamtstickstoffe vor, und diese dürften, zum Teil, auf die Mängel der analytischen Methode zurückzuführen sein. Umstehend eine tabellarische Übersicht der oben erwähnten Ergebnisse in Prozenten:

*) Die analytischen Daten beziehen sich nur auf diejenigen infizierten Versuchskolben, in welchen nach dem Versuche keine Invasion anderer Mikroben nachweisbar war. Natürlich haben wir die Versuche wiederholt, so daſs sich die Resultate als Mittel von zwei bis drei Untersuchungen darstellen.

Tabelle I.

Infiziert mit	Amid-	Diamino-	Mon-amino-	Differenz
	Stickstoff			
Bacillus megaterium	61,04	20,48	14,05	— 4.43
„ proteus vulgaris	43,57	29,62	28,54	+ 1,73
„ butyricus Hueppe	45,85	14,42	35,57	— 4.16
„ mycoides	62,15	8,62	25,09	— 4,14
„ mesentericus vulgatus	63,02	40,96	nicht bestimmt	+ 3,90
„ subtilis	61,57	18,31	12,47	— 7,65
Bacterium coli commune	52,69	21,07	20,00	— 6.24
Bacillus typhi abdominalis	67,29	10,50	17,91	— 4,80
„ fluorescens liquefaciens	22,60	56,80	15,40	— 5,20
Bacterium pyocyaneum	21,83	55,24	17,46	— 5,47
„ Hartlebii	19,52	65,71	11,42	— 3.35
„ Stutzeri	14,09	56,90	25,96	— 3,05
„ filefaciens	10,82	62,96	17,94	— 8,28
Nicht infiziert	4,33	23,72	61,51	— 5.44

2. Verhalten der Phosphorsäure.

Die Phosphorsäure wurde in einem abgemessenen Quantum der Lösung in der bekannten Weise bestimmt.

100 bis 250 ccm klaren Filtrates wurden unter Zusatz von Salpetersäure auf ein kleineres Volumen eingedampft, sodann Salzsäure mit Kaliumchlorat zugesetzt und die Mischung gekocht. Endlich wurde mit Molybdänsolution gefällt.

Die gewonnenen Resultate sind wiederum mit Bezug auf die chemische Thätigkeit der einzelnen Mikrobengattungen sehr charakteristisch.

Wie eingangs erwähnt, enthielt das ursprüngliche Knochenmehl an Gesamtphosphorsäure 19,8 Proz.

Die in Lösung übergegangene Menge Phosphorsäure ist in nebenstehender Tabelle (S. 329) auf 1000 ccm Lösung oder 10 g Knochenmehl umgerechnet und in Prozenten der Gesamtphosphorsäure ausgedrückt.

Aus diesen Ergebnissen geht die übereinstimmende Thätigkeit der Bakterien bei der Auflösung der Phosphorsäure- und der Stickstoffverbindungen des Knochenmehls hervor, und zwar sind es auch hier die Mikroben: Bacillus megaterium, Bacillus mycoides, Bacillus mesentericus vulgatus, Bacillus subtilis, Bacillus typhi abdominalis, Bacterium coli commune u. s. w., welche

Tabelle II.

Infiziert mit:	Von 10 g Knochenmehl haben sich gelöst g P_2O_5	Diese Menge in Prozenten der Gesamt-P_2O_5 ausgedrückt
Bacillus megaterium	0,427	21,56
„ proteus vulgaris	0,293	14,79
„ butyricus Hueppe	0,308	15,55
„ mycoides	0,456	23,03
„ mesentericus vulgatus	0,408	20,60
„ subtilis	0,462	23,3
„ typhi abdominalis	0,457	23,1
Bacterium coli commune	0,410	20,7
„ pyocyaneum	0,243	12,2
„ Hartlebii	0,124	6,3
„ Stutzeri	0,150	7,6
„ filefaciens	0,083	4,2
Nicht infiziert	0,076	3,83

besonders intensiv wirksam waren. Gemäſs unseren Beobachtungen hat es den Anschein, als ob das Calciumphosphat gemeinsam mit dem Calciumfluorid im Knochen in Form von organischen Verbindungen vorkommen würde und daſs erst durch die Zersetzung der organischen Materie die Moleküle des Calciumphosphates den chemischen Agentien zugänglicher werden, welche es entweder in Dicalcium- oder Monocalciumphosphat umwandeln.

Diese Prozesse zeigen sich uns auch bei der Thätigkeit der Mikroben. Einzelne Mikrobenspezies wachsen auf Kosten der Knochenmaterie zu mächtigen Bakterienkulturen heran, und mit der Thätigkeit dieser Mikroben hängt nicht nur eine intensive synthetische, sondern auch, unter gewissen Verhältnissen, eine ungemein energische spaltende Thätigkeit zusammen.

3.

Betrachten wir die gewonnenen Daten, so bemerken wir gewisse Unterschiede zwischen der ersten Gruppe von Bakterien und der Gruppe der Denitrifikationsbakterien.

Bei der ersten Gruppe, und zwar bei Bacillus megaterium, mycoides, subtilis, typhi abdominalis u. s .w., tritt der Amidstickstoff in auffälliger Weise in den Vordergrund. Von dem gesamten, in Lösung befindlichen Stickstoffe finden wir bis 67 Proz. in Form von Amidstickstoff.

In der Gruppe der Denitrifikationsbakterien sinkt der Amidstickstoff in auffallender Weise, dafür steigt wieder der Diaminostickstoff, welcher zum Beispiel bei Bacterium filefaciens auf den gesamten in Lösung befindlichen Stickstoff berechnet bis 62 Proz. und bei Bacterium Hartlebii bis 65 Proz. erreicht.

Amidstickstoff wurde bei einzelnen Denitrifikationsbakterien von 10 bis 22 Proz. konstatiert; gewifs eine geringe Menge gegenüber den Bakterien der ersten Gruppe, den sogenannten Ammonisationsbakterien. Mit einer besonders charakteristisch geringen Menge treten Bacterium filefaciens (10,32 Proz.) und Bacterium Stutzeri (14,09 Proz.) auf. Die Unterschiede, welche so auffällig bei der Zersetzung der Knochensubstanz durch die einzelnen Bakterienarten hervortreten, mufs man vor allem im spezifischen Charakter der fundamentalen Lebensfunktionen der letzteren suchen.

Die erste Bakteriengruppe und zwar Bacillus megaterium, subtilis, mycoides u. s. w., welche sich durch eine energische Zersetzung der Leimsubstanz auszeichnet, zeigt eine andere Reaktion gegenüber stickstoffhaltigen Substanzen, als die zweite Gruppe, zu der Bacterium Hartlebii, Stutzeri, filefaciens u. s. w. gehören. Verfolgen wir z. B. die Assimilation des Stickstoffs seitens der einzelnen Denitrifikationsbakterien aus dem Kalium-, Natrium- und Calciumnitrat u. s. w. bei Gegenwart gewisser Kohlehydrate, oder organischer Säuren und der übrigen anorganischen Nährstoffe, so zeigen sich Erscheinungen von ganz interessantem Charakter.

Ich habe schon Gelegenheit gehabt, in meiner oben angeführten Arbeit: „Die Stickstoffassimilation durch die lebende Bakterienzelle“, welche im verflossenen Jahrgange des „Zentralblatts für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten“ publiziert ist, darauf hinzuweisen, unter welchen Bedingungen die Lebensprozesse der Bakterien vor sich gehen, und auch auf eine geeignete, von früheren abweichende Methode hingewiesen, welche ich bei der Kultivierung der Bakterien verwendet habe, bei der ausschliefslich als Stickstoffquelle Natriumnitrat und als Kohlenstoffquelle entweder eine gewisse Art von Kohlehydraten oder von organischen Säuren verwendet erscheint. Zur besseren Orientierung führe ich hier die Zusammensetzung des Nährmediums an.

In 1000 ccm Wasser waren enthalten als Kohlenstoffquelle: 2 bis 100 g einer organischen Säure oder irgend eines Kohlehydrates, als

Stickstoffquelle: 2 bis 10 g Natriumnitrat; ferner anorganische Nährstoffe:

0,25 g Natriumphosphat (HNa_2PO_4)
0,20 „ Kaliumsulfat,
0,05 „ Calciumchlorid,
0,05 „ Magnesiumchlorid,
0,10 „ Natriumkarbonat,
0,05 „ Ferrophosphat.

Die Kolben faſsten 2300 bis 5000 ccm. Nach gründlicher Sterilisation und Ablauf des Inkubationsstadiums wurden die Kolben mit den einzelnen Bakterienspezies geimpft. Die Versuche dauerten 30 Tage. Die Kolben standen in einer geräumigen Brutkammer (in der biologischen Kammer) bei 28 bis 30° C. unter Abschluſs des Tageslichtes. Der Stickstoff wurde bestimmt in Form von Ammoniak, in Form von salpetriger und Salpetersäure, schlieſslich in organischer Form *).

Die Analysen wurden stets in mehreren Kolben durchgeführt und zwar 2- bis 3 mal. Qualitativ wurde auf die Anwesenheit der salpetrigen Säure und Salpetersäure sowie des Ammoniaks nach bekannter Methode geprüft.

Aus den umfassenden analytischen Daten und den längeren Beobachtungen über die Vorgänge in der Bakterienzelle gelangt

*) Die analytische Methode wurde in folgender Anordnung angewendet: Der Inhalt der Kolben wurde nach dem Versuche auf 2000 ccm verdünnt. Aus diesem Meſsgefäſse wurden sodann 500 ccm, event. 1000 ccm zur Bestimmung des Ammoniaks genommen. Die Destillation des Ammoniaks wurde mittels Kaliumhydroxyds und auch mit Magnesia durchgeführt. Kleine Quantitäten von Ammoniak wurden auch kolorimetrisch bestimmt. Als endgültige Ergebnisse wurden nur jene Ziffernresultate betrachtet, die sich bei der Destillation mit Magnesia und bei der kolorimetrischen Methode ergaben. Die Salpetersäure wurde durch Reduktion in alkalischer, alkoholischer Lösung mit Aluminium und Kupferzinklegierung nach der Methode von Devarda ermittelt. In den nach Bestimmung des Stickstoffs in Form von Ammoniak und Salpetersäure zurückgebliebenen Resten wurde, nach gründlicher Ansäuerung, der organische Stickstoff nach der Methode Kjeldahls ermittelt. Die salpetrige Säure wurde, neben der Salpetersäure nach der modifizierten Methode Pellets in besonders konstruierten Apparaten bestimmt.

Der Stickstoff in Form von Salpetersäure läſst sich, falls er in gröſseren Mengen vorhanden ist, in exakter Weise neben Ammoniak und organischem Stickstoff bei Gegenwart von Hexose und Pentose, sowie Disacchariden nicht genau ermitteln, wie wir uns in einer ganzen Reihe analytischer Operationen überzeugt haben, und zwar weder nach der Methode Jodlbauers noch nach jener Försters. Beide Methoden liefern regelmäſsig zu niedrige Resultate.

man zu dem folgenden Schlusse: Im Boden und im Stalldünger existieren zwei Hauptgruppen von Bakterien, welche die Metamorphose der Nitrate bewirken. Zur ersten Gruppe gehören: B. megaterium, B. mycoides, B. subtilis, B. mesentericus vulgatus, B. ramosus, Proteus vulgaris und Proteus Zenkeri, B. radicicola, Clostridium gelatinosum, B. typhi abdominalis, B. coli commune u. s. w. Diese erste Gruppe von Mikroben charakterisiert sich dadurch, dafs sie die in den Nitraten enthaltene Salpetersäure zu Ammoniak reduziert und dafs bei ihnen bisher eine Reduktion zu elementarem Stickstoff nicht beobachtet wurde.

Die zweite Gruppe, zu welcher gehören: B. Hartlebii, B. fluorescens liquefaciens, B. pyocyaneum, B. Stutzeri, B. centropunctatum, B. filefaciens, B. denitrificans [B. denitrificans und B. coli commune*)] B. nitrovorum u. s. w., zeichnet sich dadurch aus, dafs sie den Nitratstickstoff in einem geeigneten Nährmedium in elementaren Stickstoff überführt.

Die Grunderscheinung bei beiden Bakteriengruppen ist, dafs über die Lebensvorgänge der bezeichneten Bakterien in erster Linie das Nährmedium entscheidet. Enthält nämlich das Nährmedium als Kohlenstoffquelle eine organische Säure, z. B. Milchsäure, Buttersäure, Bernsteinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure u. s. w. (mit Natriumkarbonat neutralisierte organische Säuren), und aus der Gruppe der Kohlehydrate die d-Glukose, die Saccharose, dann ruft der überwiegende Teil der zweiten Bakteriengruppe Nitratgärung hervor, während die Salpetersäure, die in den Nitraten enthalten ist, in Nitrite und schliefslich in elementaren Stickstoff übergeht.

Enthält jedoch das Nährmedium zum Beispiel l-Xylose, l-Arabinose, dann reduziert der überwiegende Teil der Bakterien (B. Hartlebii und B. fluorescens liquefaciens sowie B. denitrificans, B. coli commune ausgenommen) Salpetersäure zu Nitrit und Ammoniak und nur in seltenen Fällen zu elementarem Stickstoff. Eine Nitratgärung tritt nicht auf. d-Lävulose und d-Galaktose zeigen sich uns überhaupt als schlechte Kohlenstoffquellen für eine ganze Reihe Denitrifikationsmikroben (B. Hartlebii ausgenommen). In der d-Lävulose und d-Galaktose ist selten eine Nitratgärung zu beobachten.

Betreffs der ersten Gruppe von Bakterien bemerken wir, dafs es hauptsächlich die Kohlehydrate sind, und zwar die d-Glykose,

*) d. h. in Synergie.

Saccharose, Maltose, l-Xylose, l-Arabinose, welche uns als vorzügliche Kohlenstoffquellen für die Lebensprozesse der Mikroben erscheinen. Hier bemerken wir auch, daſs die Bakterien die in den Nitraten enthaltene Salpetersäure zu salpetriger Säure und schlieſslich zu Ammoniak reduzieren. Nitratgärung wurde von mir bei dieser Gruppe bisher nicht beobachtet. Wir sehen, daſs in beiden Fällen, sowohl bei der Nitratgärung, als auch bei der bloſsen Reduktion der Nitrate in Ammoniak, als primäres Produkt salpetrige Säure auftritt. Bei der Salpetergärung wird der Stickstoff der salpetrigen Säure zu elementarem Stickstoff reduziert und, falls Nitratgärung nicht eintritt, dann wird die salpetrige Säure bis zu Ammoniak reduziert.

In beiden Fällen, d. i. sowohl bei der Nitratgärung, als auch bei der Überführung der salpetrigen Säure in Ammoniak, entsteht Eiweiſsstickstoff. Die Bildung des Eiweiſsstickstoffs ist in erster Linie von dem Wachstum und der Entwickelung der Bakterien und der damit in Verbindung stehenden Energie der Nitratgärung oder Ammonisation der Nitrate abhängig. Mit der Energie beider Prozesse wächst auch die Bildung des Eiweiſsstickstoffes. Alle diese Prozesse sind abhängig: 1. von dem Verhältnisse der Menge der organischen Säure oder des Kohlehydrates zur Menge des Nitrats im Nährmedium; 2. von der Konzentration der Lösung; 3. von der Temperatur; 4. von der Gegenwart oder Abwesenheit des Sauerstoffes, d. h. inwiefern der Prozeſs ein aerobiotischer oder ein anaerobiotischer ist oder nicht; 5. von der Dauer des Gärungs- oder Ammonisationsprozesses.

Sind alle Bedingungen für eine energische Gärung vorhanden, dann verwandelt sich der Nitratstickstoff in elementaren und organischen Stickstoff. Salpetrige Säure und Ammoniak lassen sich nicht konstatieren. Je mehr von gewissen Kohlehydraten oder organischen Säuren im Nährmedium vorhanden ist, desto mehr organischer Stickstoff bildet sich. So z. B. entsteht bei Verwendung einer 0,2- bis 0,5 proz. Lösung von Natriumnitrat und einer 2- bis 10 proz. Lösung von Kohlehydraten oder organischen Säuren im Nährmedium im Verlaufe von 10 Tagen bei einer Temperatur von 28 bis 30° C. 30 bis 60 Proz. Stickstoff in organischer Form, während der übrige Teil sich in elementaren Stickstoff verwandelt, allerdings den gesamten Stickstoff, der im Natriumnitrat enthalten ist, der Rechnung zu Grunde gelegt.

Ist aber das Nährmedium so zusammengesetzt, daſs sich in demselben 0,2 Proz. Natriumnitrat und 0,2 bis 0,4 Proz. organische

Säuren (in neutralisiertem Zustande) oder gewisse Kohlehydrate befinden, dann entstehen im Laufe von 10 Tagen 5 bis 20 Teile organischen und 80 bis 95 Teile elementaren Stickstoffs aus 100 Teilen Salpeterstickstoff.

Ist das Gärungsvermögen ein sehr geringes, so dafs die Gärungserscheinungen nur sehr langsam verlaufen, oder ist die Nitratgärung eine unvollständige oder nur geringfügige, dann bleibt noch nach 10 Tagen eine ziemliche Menge von Stickstoff, die im Natriumnitrat vertreten ist, unberührt, und wir sind in der Lage, Salpetersäure, salpetrige Säure, aber auch Ammoniak neben organischem Stickstoff und solchem von elementarer Form zu konstatieren, aber auch, was von besonderem Interesse ist, Alkohol!

Bei der ersten Gruppe von Bakterien, bei welcher wir ausschliefslich einen Prozefs der Ammonisation des Nitrats wahrnehmen, bemerken wir, dafs das Verhältnis des Natriumnitrats zur Menge des Kohlehydrats, das im Nährmedium vertreten ist, eine grofse Rolle spielt. Finden sich z. B. im Nährmedium 0,2 Proz. Natriumnitrat und 2 bis 10 Proz. Kohlehydrat, dann finden wir nach Ablauf von 30 Tagen 40 bis 70 Proz. organischen Stickstoffs (hauptsächlich in Form von Eiweifsstoffen), den übrigen Teil des Stickstoffs in Form von Ammoniak und manchmal auch in einer gewissen Menge in Form von salpetriger Säure. Die Nitrate verschwinden. Ist eine geringere Menge von Kohlehydraten vorhanden, insbesondere d-Glykose, Saccharose, Maltose u. s. w., dann bemerken wir einen geringeren Ammonisationseffekt, sowie eine verminderte Bildung organischen Stickstoffs. Die salpetrige Säure ist immer in grofsen Mengen nachzuweisen. Einen grofsen Einflufs auf alle diese Prozesse hat die Wahl der Kohlehydrate, so z. B. mufs man die d-Lävulose und d-Galaktose als ein sehr ungeeignetes Material für die Ammonisationsprozesse ansehen. Die ganze Reihe der hier namhaft gemachten Bakterien der ersten Gruppe wachsen in d-Lävulose und d-Galaktose überhaupt nicht, oder sie entwickeln sich nur schlecht. Die Bakterien sind also in Bezug auf die Konfiguration des Moleküls der Kohlehydrate sehr wählerisch.

Ungemein interessante Erscheinungen können wir beobachten, wenn wir das Verhalten der verschiedenen Bakterienarten zum Asparagin oder zum Kollagen des Knochens (Ossein) neben Natriumnitrat verfolgen. Bereiten wir die Nährflüssigkeit derart, dafs sich neben anorganischem Stickstoff auch Asparagin oder Kollagen in der Lösung vorfindet, dann beobachten wir, dafs die

erste Gruppe von Bakterien und zwar B. mycoides, subtilis, mesentericus vulgatus, megaterium u. s. w., also Bakterienarten, welche die Nitrate in der ersten Phase in Nitrite reduzieren und in der zweiten Phase Ammoniak (und organischen Stickstoff) bilden, dem Asparagin oder Kollagen in der Bildung von neuer, lebender Materie dem Nitratstickstoff gegenüber den Vorzug geben. Die Nitrate erscheinen in geringerem Maſse angegriffen, wenn gewisse organische, stickstoffhaltige Stoffe im Nährmedium enthalten sind.

Eine andere Erscheinung nehmen wir bei der zweiten Gruppe wahr. Diese als Denitrifikationsbakterien gekennzeichneten Mikroben geben umgekehrt dem Nitratstickstoff dem Stickstoff der organischen, stickstoffhaltigen Substanzen gegenüber den Vorzug. Die Versuche zur Lösung dieses interessanten Problems erfolgten nach einem ähnlichen Verfahren, wie es schon eingangs angeführt wurde.

Ein Teil der Gefäſse enthielt in 1000 ccm: 2 g Glykose, 2 g Natriumnitrat und entweder 2,5 g Asparagin oder 3 g Kollagen. An anorganischen Nährstoffen waren die schon oben angegebenen enthalten.

Die Nährflüssigkeiten wurden sterilisiert und im Inkubationsstadium belassen. Nach 14 Tagen wurden 28 der Kolben infiziert und 6 als blinde Versuche nach 30 Tagen verarbeitet.

Die Kolben enthielten den Stickstoff in den nachstehenden Formen.

A. Das Nährmedium mit Asparagin.

Das Asparagin enthielt 18,5 Proz. N. Es waren daher in 2,5 g 0,4625 g Stickstoff enthalten. Der Durchschnitt der Analysen ergab folgende Resultate:

Die Destillation lieferte:

Mit MgO . . . . N = 0,0776 g
„ NaOH [nach 30 Min.*)] N = 0,2324 „
N bestimmt nach der Methode Kjeldahls**) . . . . . . = 0,2260 „
N in Form des Nitrats . . . = 0,3282 „
Der mittels Destillation mit NaOH und nach der Methode Kjeldahls bestimmte Stickstoff beträgt . . . 0,4584 g.

*) In einem besonderen Anteil der Nährflüssigkeit.

**) Nach der Destillation mit NaOH und Austreibung des N_2O_5 in einem besonderen Teile der Nährflüssigkeit. Die zur Bestimmung des Stickstoffs angewendete Methode ist oben beschrieben.

B. Nährflüssigkeit mit dem Kollagen des Knochens (Ossein).

Das Kollagen enthielt 17,02 Proz. N; in 3 g sind daher 0,510 g Stickstoff enthalten.

Die durchschnittlichen Analysen ergaben:

Bei der Destillation mit MgO an N	=	0,034 g
„ „ „ „ NaOH an N	=	0,039 „
[nach 30 Minuten*)] . . . an N	=	0,100 „
Stickstoff in Form des Nitrats: . .	=	0,325 „
Stickstoff bestimmt nach der Methode Kjeldahls nach der Austreibung N_2O_5**)	=	0,390 „
Der durch die Destillation mit NaOH gewonnene und nach der Methode von Kjeldahl bestimmte Stickstoff beträgt	=	0,490 g.

Die Kolben wurden mit folgenden Bakterienspezies geimpft:

Bac. mycoides, Bac. typhi abdominalis, ferner mit Bacterium Hartlebii und Bacterium nitrovorum, Bac. typhi abdominalis und Bac. denitrificans.

Die Kolben wurden bei einer Temperatur von 28 bis 32° C. in der Brutkammer belassen. Nach 30 Tagen wurden die Resultate erhalten, welche aus der angeschlossenen Tabelle III (S. 337) ersichtlich sind.

Aus der Tabelle geht sehr klar hervor, zu welcher Intensität die Fähigkeit der einzelnen Bakterien, stickstoffhaltige organische Substanzen bei Gegenwart von Nitraten zu zersetzen, ansteigt.

Es ist eine bemerkenswerte und nicht wenig lehrreiche Erscheinung, dafs die Denitrifikationsbakterien, welche in einem geeigneten Nährmedium eine Nitratgärung bewirken, nicht jene Energie in der Zersetzung stickstoffhaltiger Stoffe besitzen, wie so viele Bakterien, welche die Salpetersäure in salpetrige Säure und schliefslich bis in Ammoniak überführen (Bac. mycoides, Bac. subtilis, megaterium, mesentericus vulgatus, typhi abdominalis, Bact. coli commune u. s. w.). Diese Gruppe von Bakterien, welche uns nicht nur die organischen, stickstoffhaltigen Stoffe mit gröfserer Energie zersetzt und als schliefsliches Produkt Ammoniak bildet und weiter Salpetersäure in salpetrige Säure und schliefslich in

*) In einem besonderen Anteil der Nährflüssigkeit.

**) Nach der Destillation mit NaOH und Austreibung des N_2O_5 in einem besonderen Teile der Nährflüssigkeit. Die zur Bestimmung des Stickstoffs angewendete Methode ist oben beschrieben.

Tabelle III.

	Bakterienart	Nährflüssigkeit	Stickstoff bestimmt*)				
			Destillation mit MgO. g	Destillation mit NaOH. g	In Form des Nitrats g	Nach der Methode Kjeldahls g	Destillation mit NaOH u. nach d. Methode Kjeldahls. g
Infiziert mit	1. Bacillus mycoides	Asparagin + Glukose + $NaNO_3$	0,382	0,421	0,308	0,079	0,500
	2. „ „	Kollagen + Glukose + $NaNO_3$	0,281	0,362	0,298	0,148	0,510
	3. „ typhi abdominalis	Asparagin + Glukose + $NaNO_3$	0,405	0,400	0,316	0,112	0,512
	4. „ „ „	Kollagen + Glukose + $NaNO_3$	0,204	0,400	0,309	0,130	0,530
	5. Bacterium Hartlebii	Asparagin + Glukose + $NaNO_3$	0,098	0,285	—	0,202	0,487
	6. „ „	Kollagen + Glukose + $NaNO_3$	0,053	0,154	—	0,341	0,495
	7. „ nitrovorum	Asparagin + Glukose + $NaNO_3$	0,092	0,208	—	0,290	0,498
	8. „ „	Kollagen + Glukose + $NaNO_3$	0,063	0,184	—	0,288	0,472
	9. Bac. denitrificans + Bac. typhi abdominalis	Kollagen + Glukose + $NaNO_3$	0,050	0,206	—	0,290	0,496
Nicht infiziert	—	Asparagin + Glukose + $NaNO_3$	0,0776	0,2324	0,3282	0,2260	0,4584
	—	Kollagen + Glukose + $NaNO_3$	0,0340	0,1000	0,325	0,390	0,490

*) Diese Analysen wurden bei uns ausgeführt von Dr. Hals aus Christiania und Assistenten Eugen Vitak.

Ammoniak umwandelt, wie bereits angeführt, bezeichnen wir als „Ammonisationsbakterien". Die Denitrifikationsbakterien finden die faktische Quelle für ihr energisches Wachstum hauptsächlich in den Nitraten; der organische Stickstoff ist für sie ein minder wertvolles Nährmedium. Aus der Tabelle ersieht man, daſs die Nitrate aus dem Nährmedium vollständig verschwunden sind, und der Salpeterstickstoff teils zur Eiweiſssynthese der neuen Mikrobenzellen verwendet, teils in elementaren Stickstoff übergeführt wurde. Über die Anwesenheit und Wirkung der proteolytischen Enzyme der beiden Bakteriengruppen, und zwar sowohl bei den Ammonisationsbakterien als auch den Denitrifikationsbakterien, werden wir in einem nächsten Artikel berichten.

XVI.

Über die Verdauung und Resorption der Eiweifskörper im Magen und im Anfangsteil des Dünndarmes.

Von Dr. E. Zunz (Brüssel).

Vor kurzem habe ich*) über Versuche berichtet, welche den quantitativen Verlauf der peptischen Verdauung der Eiweifskörper in vitro betrafen. Obgleich es nicht an Untersuchungen fehlt, welche die Verdauung und Resorption der Eiweifskörper im lebenden Magen und Darm zum Vorwurfe hatten, so schien es doch von Interesse, die neueren Methoden, welche eine annähernde gesonderte Bestimmung der einzelnen bei der Verdauung auftretenden Stoffe ermöglichen, auf die im Leben gegebenen Verhältnisse anzuwenden.

Im nachstehenden teile ich die Ergebnisse solcher ausschliefslich an Hunden ausgeführten Versuche mit.

1. Die Verdauung von gekochtem Fleisch im Magen und Dünndarme des Hundes.

Hunden von 7 bis 10 kg wurde gekochtes frisches Rindfleisch verabreicht. Die Wahl dieser Nahrung erfolgte, um den normalen Ernährungsverhältnissen möglichst nahe zu bleiben.

Da nicht ohne weiteres angenommen werden durfte, dafs die für die Verdauungsprodukte anderer Eiweifskörper gefundene Methodik auch auf die aus Fleisch hervorgehenden angewendet werden darf, so mufsten einschlägige Versuche über die Fällungsgrenzen der aus Fleisch erhältlichen Albumosen vorausgeschickt werden. Ich habe daher gekochtes Rindfleisch der künstlichen Pepsinverdauung unterworfen und die erhaltene Lösung mit Zink-

*) E. Zunz, diese Beiträge 2, 435 (1902).

sulfat fraktioniert. Es ergab sich folgendes: Beträgt die Menge der in Lösung gegangenen Eiweifsstoffe ungefähr 2 Proz., so ist die untere Fällungsgrenze der ersten Fraktion durch 0,24 Zinksulfatsättigung gegeben, die obere durch 0,44 Sättigung. Die zweite und die dritte Fraktion werden bei Sättigung von 0,56 bis 0,62 bezw. 0,72 bis 0,82 gefällt. Die Fällung der vierten Fraktion beginnt bei 0,88 Sättigung und ist bei vollständiger Sättigung mit feingepulvertem Zinksulfat beendigt. Die Fällungsgrenzen der verschiedenen Fraktionen nähern sich demnach am meisten den unter gleichen Umständen aus krystallisiertem Serumalbumin erhaltenen*).

Auf Grund meiner und E. P. Picks**) Untersuchungen ergiebt sich, dafs diese Fraktionen nachstehende Verdauungsprodukte enthalten:

Die erste Fraktion: die Proto- und Heteroalbumose;

die zweite Fraktion: ein Gemenge sekundärer Albumosen;

die dritte Fraktion: die primäre B-Albumose [Synalbumose Hofmeisters***)] und sekundäre Albumosen;

die vierte Fraktion die C-Albumose Picks, ein sekundäres, den Peptonen nahestehendes, bereits sehr einfach gebautes Produkt. Wie ersichtlich, enthalten die zweite und dritte Fraktion Gemenge von Albumosen, deren Zusammensetzung nach dem Stadium der Verdauung sehr erheblich wechseln kann, während die erste und die vierte Fraktion bestimmten Stufen der Verdauung entsprechen.

Im Filtrat von IV finden sich die Peptone (im Sinne Kühnes)- die den Peptonen noch nahestehenden komplexen, aber keine Biuretreaktion darbietenden Vorstufen der Aminosäuren, für welche Hofmeister***) jüngst den Namen „Peptoide" in Vorschlag gebracht hat, endlich die Aminosäuren selbst, das Ammoniak und die sonstigen Endprodukte der peptischen Spaltung. Da ich vielfach diese fünfte Fraktion durch Fällung mit Phosphorwolframsäure weiter zu zerlegen versucht habe, so sei gleich hier bemerkt, dafs von den in ihr enthaltenen Stoffen das Ammoniak, die basischen Endprodukte (Arginin, Lysin und andere) und die Peptone durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, sowie dafs die Menge der fällbaren Stoffe mit der Verdauungsdauer zunimmt, vermutlich durch Spaltung der Peptoide zu Endprodukten.

---

*) E. Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chemie 27, 247 (1899).

**) E. P. Pick, diese Beiträge 2, 481 (1902).

***) F. Hofmeister, Ergebnisse der Physiologie. Herausgegeben von Asher und Spiro. I. Jahrg., I. Abt., S. 782.

A. Erste Versuchsreihe.

Untersuchung des Mageninhaltes.

Das Versuchstier erhält nüchtern 500 g frisch gekochtes, klein gehacktes, möglichst von Fett befreites Rindfleisch. Das Tier verschlingt gewöhnlich das gesamte ihm gereichte Fleisch auf einmal.

Nach Ablauf der bestimmten Versuchsdauer wird das Tier durch Chloroform rasch getötet, die Bauchhöhle eröffnet, die Speiseröhre vorsichtig gleich über der Cardia und das Duodenum unmittelbar unter dem Pförtner unterbunden, sodann der Magen von der Speiseröhre und dem Duodenum abgetrennt und die Aufsenfläche sorgfältig durch Abspülen von anhaftendem Blut befreit.

Dann öffnet man den Magen und fängt dessen teils festen, teils breiigen oder flüssigen Inhalt in einer Porzellanschale auf, spült die Magenschleimhaut mehrmals mit destilliertem Wasser ab und fügt die Waschwässer dem Mageninhalt hinzu. Die erhaltene Flüssigkeit ist gelblichbraun, stark sauer und enthält feste Partikelchen. Sie wird aufgekocht und nach dem Erkalten auf ein feuchtes Filter gebracht. Hierauf bestimmt man nach Kjeldahl die in 10 ccm des erhaltenen klaren Filtrates enthaltene Stickstoffmenge.

Da die oben angeführten Fällungsgrenzen der einzelnen Albumosenfraktionen an Verdauungslösungen bestimmt waren, welche etwa 2 Proz. gelöste und verdaute Eiweifsstoffe enthielten, so mufs das Filtrat, ehe es der Fraktionierung unterworfen wird, je nach Bedarf durch Einengen oder Verdünnen auf diese Konzentration gebracht werden. Dann wird es sorgfältig mit verdünnter Natronlauge neutralisiert, um das Acidalbumin zu entfernen, und die Verteilung des Stickstoffes unter die verschiedenen Fraktionen nach der in meinen früheren Mitteilungen*) beschriebenen Methode ermittelt. In einigen dieser Versuche habe ich die Stickstoffmenge bestimmt, welche sich im Neutralisationspräcipitat findet. Die so erhaltene Zahl entspricht dem gröfsten Teil des im Acidalbumin enthaltenen Stickstoffes.

Die Bestimmung der Verteilung des Stickstoffes wurde nur ausgeführt, wenn ich mich überzeugt hatte, dafs die Magenschleimhaut keine Verletzung zeigte, sich somit kein Blut mit dem Mageninhalt vermischt hatte, und dafs der Magen keine Speisereste oder sonstige störende Beimengungen (Knochenstückchen, Gras, Kartoffeln) enthielt.

Manchmal weist der Mageninhalt Spuren von Schleim auf, dessen man sich nicht durch Koagulation entledigen kann. Dieser wird durch Zinksulfat unter 0,30 Sättigung gefällt, also mit der ersten Albumosenfraktion niedergerissen. Unterwirft man ihn der peptischen Verdauung, so entstehen Albumosen, deren Fällungsgrenzen durch Zinksulfat nicht von jenen der gewöhnlichen Albumosenfraktionen abweichen. Der Fehler, welchen allenfalls die Gegenwart des Schleims und der daraus gebildeten Albumosen veranlafst, kann, da es

*) E. Zunz, Zeitschr. f. physiol. Chemie 28, 132 (1899). — Diese Beiträge 2, 435 (1902).

sich stets nur um verschwindend geringe Mengen handelt, nur unbedeutend sein.

In Tabelle I sind die in den einzelnen Fraktionen ermittelten Stickstoffwerte in Prozenten des Gesamtstickstoffes der Verdauungslösung angeführt.

Tabelle I.

Versuchshund	Gewicht in Grammen	Verdauungszeit in Stunden	Proz. N. enthalten								
			im Acid-albumin	in den Albumosen					in den anderen Verdauungsprodukten, und zwar		
				Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III	Fraktion IV	Gesamtmenge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
A	9800	$^1/_2$	Spuren	42,60	14,68	20,84	12,52	90,64	1,20	8,16	9,36
B	10050	1	5,98	5,07	8,14	22,17	43,93	79,31	3,18	11,53	14,71
C	9500	2	7,53	45,66	21,28	22,55	1,71	91,20	0,64	0,63	1,27
D	7200	3	Spuren	54,76	21,99	18,05	4,08	98,57	0,79	0,64	1,43
E	8800	4	2,02	14,67	15,55	53,45	9,98	93,65	1,36	2,97	4,33
F	8600	4	Spuren	44,33	2,59	22,07	21,07	91,06	2,98	6,96	9,94
G	8950	4	"	—	—	—	—	92,13	3,64	4,23	7,87
H	9700	6	"	39,93	31,54	13,50	12,58	97,55	1,00	1,45	2,45

Hierzu sei noch bemerkt: das albumosenfreie Filtrat gab deutlich die Biuretreaktion bei den Hunden B, G und H, schwach bei den Hunden E und F; sie fehlte gänzlich bei den anderen.

Die vorstehende Tabelle lehrt zunächst, dafs die im Magen vorhandene Verdauungslösung, zu welchem Zeitpunkt der Verdauung man sie auch gewinnen mag, von Verdauungsprodukten weitaus überwiegend Albumosen enthält. Nur in einem unter 8 Fällen betrug die Menge des Albumosenstickstoffes weniger als 90 Proz. des Gesamtstickstoffes. Hingegen ist das Acidalbumin stets nur in sehr geringer Menge, oft nur in Spuren, vorhanden, und auch die Gesamtmenge der Peptone, Peptoide und Endprodukte geht nur ausnahmsweise über 10 Proz. des Gesamtstickstoffes hinauf. Während nach dem Ergebnis der qualitativen Untersuchung Peptone in einzelnen Versuchen ganz fehlen, scheinen

Peptoide und Endprodukte stets, wenn auch zum Teil in sehr geringen Mengen, vorhanden zu sein.

Die sehr grofsen Unterschiede in betreff der einzelnen Albumosenfraktionen lassen keinerlei Regelmäfsigkeit, namentlich auch keine Abhängigkeit von der Dauer der Verdauung erkennen.

Im ganzen und grofsen entsprechen die gefundenen Zahlen wegen des Überwiegens der Albumosen etwa jenen, welche man bei kurzdauernder künstlicher Verdauung*) erhält, nur zeigt bei dieser das Auftreten der einzelnen Albumosen eine gewisse Regelmäfsigkeit. Auch fehlen da die Peptone nie.

Die Ergebnisse der Versuchsreihe stimmen in wesentlichen Punkten mit Beobachtungen von A. Cahn, Gillespie und Ewald überein.

A. Cahn**) brachte Hunden Fleischpulver mit Wasser bei und bestimmte in mit der Sonde entnommenen Proben des Mageninhaltes zu verschiedenen Zeitpunkten deren Gehalt an Verdauungsprodukten. Schon eine halbe Stunde nach der Darreichung war eine erhebliche Menge von Verdauungsprodukten gebildet, ja die absolute Menge war zu diesem Zeitpunkte gröfser als später. Syntonin fand sich während der ganzen Dauer der Verdauung nur in sehr geringer Menge.

Gillespie***) fand im Mageninhalt von Hunden, welche gekochtes Fleisch gefressen hatten und während der Verdauung getötet wurden, viel Albumosen und sehr wenig oder gar keine Peptone.

Ewald†) nimmt an, dafs beim Menschen die Menge der echten Peptone im Magen stets äufserst gering ist und dafs der gröfste Teil der Körper, welche im Mageninhalt die Biuretreaktion geben, aus Albumosen besteht.

B. Zweite Versuchsreihe.

Untersuchung von Magen- und Darminhalt.

In dieser Versuchsreihe habe ich aufser im Magen auch im Anfangsteil des Dünndarmes die Menge der einzelnen Verdauungsfraktionen zu bestimmen getrachtet.

Die Versuche wurden in gleicher Art wie in der vorigen Versuchsreihe ausgeführt, nur wurde aufser dem Magen auch das oberste

*) Es ist selbstverständlich, dafs ein Vergleich der Verdauung von Fleisch, also eines Gemenges von verschiedenen echten Eiweifskörpern mit Nucleoproteiden, Kollagen und anderen stickstoffhaltigen Substanzen, mit der Verdauung homogener Eiweifskörper nur in groben Zügen gestattet ist.

**) A. Cahn, Zeitschr. f. klin. Mediz. 12, 34 (1887).

***) A. L. Gillespie, Proceed. of the Royal Society 62, 10 (1897).

†) Citiert bei C. A. Ewald und Gumlich, Berlin. klin. Wochenschr. 27, 1016 (1890).



50 cm lange Stück des Dünndarmes zwischen Ligaturen gefafst und sein Inhalt gesondert zur Untersuchung gebracht.

Schneidet man das aufsen sorgfältig abgespülte Darmstück auf, so erhält man stets nur sehr wenig flüssigen Inhalt. Man spült sodann den das Duodenum bedeckenden Belag sorgfältig ab und vereinigt Inhalt und Spülflüssigkeit. Die Reaktion der leicht gelblichen Flüssigkeit ist entsprechend den Angaben von Nencki*), Gillespie und Munk**) schwach sauer.

Nie konnte ich im Inhalt des Dünndarmes unverändertes, vom Magensaft nicht angegriffenes Fleisch nachweisen.

Die Verarbeitung geschah in der oben beschriebenen Weise. Waren Parasiten (Bandwürmer, Askariden) im Darminhalt vorhanden, so wurde von der Untersuchung abgesehen.

Tabelle II.

Versuchshund	Gewicht in Grammen	Verdauungszeit in Stunden	Untersuchter Teil des Verdauungskanals	Proz. N enthalten in							
				den Albumosen					den anderen Verdauungsprodukten		
				Fraktion I	Fraktion II	Fraktion III	Fraktion IV	Gesamtmenge	durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
I	7600	4	Magen	61,23	4,66	9,18	14,27	89,34	2,89	7,77	10,66
			Darm	48,30	20,39	20,14	6,09	94,92	0,42	4,66	5,08
J	9600	6	Magen	34,07	11,18	26,62	18,12	89,99	1,08	8,93	10,01
			Darm	4,70	1,76	51,19	26,08	83,73	1,85	14,42	16,27
K	8700	8	Magen	48,90	22.16	17,09	7,36	95,51	0,64	3,85	4,49
			Darm	29,97	0,31	10,00	5,36	45,64	6,99	47,37	54,36
L	9500	10	Magen	37,90	22,70	20,99	14,96	96,55	1,05	2,40	3,45
			Darm	6,79	0,00	22,43	14,99	44,21	8,51	47,28	55,79
M	8500	4	Magen	—	—	—	—	85,93	3,93	10,14	14,07
			Darm	—	—	—	—	76,42	4,60	18,98	23,58
N	8300	6	Magen	—	—	—	—	98,13	0,85	1,02	1,87
			Darm	—	—	—	—	71,07	3,49	25,44	28,93
O	8900	8	Magen	—	—	—	—	89,33	2,16	8,51	10,67
			Darm	—	—	—	—	44,13	6,14	49.73	55,87
P	9300	10	Magen	—	—	—	—	90,21	1,67	8,12	9,79
			Darm	—	—	—	—	32,20	11,24	56,56	67,80

*) A. Macfayden, M. Nencki und N. Sieber, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. 28, 319 (1891).

**) I. Munk, Zentralbl. f. Physiol. 16, 33 (1902).

Es fanden sich Spuren von Acidalbumin in allen aus dem Magen oder auch aus dem obersten Teil des Dünndarmes herrührenden Flüssigkeiten.

In den albumosenfreien Filtraten erhielt man Biuretreaktion bei dem Mageninhalt der Hunde I, J (nur schwach), M, O und P, sowie auch bei dem Inhalt des ersten Teiles des Dünndarmes der Hunde K, L, O und P. Der Mageninhalt der Hunde K, L, N und der Inhalt des ersten Teiles des Dünndarmes der Hunde I, J, M, N enthielten keine echten Peptone.

Die vorstehende Tabelle bestätigt in betreff der Magenverdauung des Fleisches einfach die in der vorigen Versuchsreihe erhaltenen Befunde.

In betreff der Darmverdauung lehrt sie, daſs der Anteil der Albumosen an den im obersten Dünndarm anzutreffenden Verdauungsprodukten in den ersten Stunden ebenso hoch sein kann als im Magen, daſs er aber, wie aus den beiden Versuchsserien I J K L und M N O P übereinstimmend hervorgeht, in den späteren Stunden mit groſser Regelmäſsigkeit sinkt, während die Menge der übrigen Verdauungsprodukte entsprechend ansteigt. Schlieſslich wird die Quantität der Albumosen von jener der übrigen Verdauungsprodukte übertroffen. Unter diesen herrschen dann bei weitem die durch Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Substanzen vor. Was die Menge der einzelnen Albumosenfraktionen anlangt, läſst sich für den Darm so wenig wie für den Magen eine Abhängigkeit von der Verdauungsdauer erkennen mit Ausnahme der Fraktion II, welche (in der ersten Versuchsreihe) eine sehr rasche Verminderung nach der vierten Stunde aufweist und schlieſslich verschwindet.

Über den Verlauf der Dünndarmverdauung sei noch folgendes bemerkt: Während der ersten zwei Stunden enthielten das Duodenum und der Anfangsteil des Jejunums nur ein wenig Schleim. Dann aber traten nach und nach, schon nach zwei Stunden, ein gelblicher, mehr oder minder dicker Belag auf der Darmwand und etwas gelbliche Flüssigkeit auf. Das Darmstück enthielt nach acht- und zehnstündiger Verdauung sicher eine gröſsere Menge Verdauungsprodukte als nach vier- und sechsstündiger. Nach zehn Stunden befanden sich im Magen noch etwas sehr dicker Brei, der unzersetzte Fleischstücke enthielt, und, nahe dem Pförtner, eine bräunliche Flüssigkeit. Bei zwei, zwölf Stunden nach der Fütterung getöteten Hunden war der Magen ganz leer, während der erste Teil des Dünndarmes bei dem einen nur Schleim, bei dem anderen eine sehr geringe Menge eines gelb-

lichen Belages aufwies. Diese Angaben stimmen völlig mit den wichtigen Beobachtungen von Schmidt-Mülheim*) über die Fleischverdauung beim Hunde überein.

Betreffs der Bildung der Albumosen und sonstigen Verdauungsprodukte herrscht zwischen den bisherigen Beobachtern wenig Übereinstimmung, wobei allerdings zu berücksichtigen ist, dafs die benutzten Nachweismethoden zum Teil untereinander nicht vergleichbare Resultate geben.

Dafs die Aufspaltung der Eiweifskörper im Dünndarm mittels Trypsin durch das Stadium der Albumosen und Peptone hindurch bis zur Bildung von Endprodukten (Leucin, Tyrosin u. s. w.) gehen kann, ist schon von Kühne**) bewiesen worden. Schmidt-Mülheim***) fand bei quantitativen Versuchen die Bildung der krystallinischen Endprodukte so gering, dafs er ihr jede Bedeutung für die Eiweifsresorption abspricht. Nach seiner wie Kühnes Vorstellung wird die Hauptmenge des eingeführten Eiweifses von der Darmschleimhaut in Form von näheren Verdauungsprodukten (Albumosen und Peptonen) aufgenommen.

Hofmeister†) beobachtete an mit Fleisch gefütterten Hunden, dafs die absolute Menge der im Dünndarm nachweisbaren Biuretreaktion gebenden Produkte (Albumosen und Peptone) bis zur siebenten Stunde nach der Mahlzeit zunahm, dann langsam abnahm. Nur einmal unter zehn Versuchen war Fleisch aus dem Magen in den Darm übergetreten.

Neumeister††) fand im Dünndarm auch nach sehr reichlicher Mahlzeit keine Peptone im Dünndarm, selbst wenn der Magen solche enthielt. Daraus schliefst er, dafs die Eiweifsstoffe wahrscheinlich im Dünndarme als Syntonin oder Kühnesche primäre Albumosen resorbiert werden.

Nencki, Macfayden und Sieber†††) trafen in dem Darminhalt, welcher aus einer am untersten Dünndarm befindlichen Fistel einer Frau abflofs, wohl Eiweifs und Pepton, aber kein Leucin und Tyrosin an.

---

*) A. Schmidt-Mülheim, Archiv f. Anat. und Physiol. Physiol. Abt. 1879, S. 39.

**) W. Kühne, Archiv für pathol. Anat. u. Physiol. u. f. klin. Medizin. 39, 155 (1867).

***) A. Schmidt-Mülheim, Archiv f. Anat. und Physiol., Physiol. Abt. 1879, S. 39.

†) Fr. Hofmeister, Zeitschr. f. physiol. Chemie 6, 51 (1882). Hofmeister bezeichnet dort die gesamten nicht koagulablen, Biuretreaktion darbietenden Verdauungsprodukte dem damaligen Brauche gemäfs als „Pepton".

††) R. Neumeister, Sitzungsber. d. physik.-med. Gesellschaft zu Würzburg 1889, S. 70.

†††) A. Macfayden, M. Nencki und N. Sieber, loc. cit.

Gillespie*) fand beim Hund nie Albumosen im Inhalt des Duodenum und Jejunum, während das Jejunum Spuren von Peptonen enthielt.

Andererseits glaubt Capparelli**), dafs das Endprodukt der Eiweifsverdauung im Darm nicht echtes Pepton ist, sondern ein viel einfacher gebauter, im Wasser löslicher, in konzentriertem Alkohol unlöslicher, sehr leicht dialysierbarer Körper. Capparelli glaubte auch diesen Körper (ein „Peptoid" in obigem Sinn) aus Eiweifs in vitro durch vereinigte Wirkung von Trypsin, Pepsin und Ptyalin erhalten zu haben.

Noch weiter gehen Kutscher und Seemann***), welche Albumosen und Peptone im Darminhalt bei mit Fleisch gefütterten Hunden nicht in nennenswerter Menge nachweisen konnten und daher annehmen, dafs ein wesentlicher Teil der Eiweifskörper im Dünndarm bis zur Bildung krystallinischer Produkte gespalten wird.

Der Widerspruch in diesen weit auseinander gehenden Befunden wird auf Grund meiner quantitativen Versuche zum grofsen Teil verständlich, da es ganz vom Stadium der Verdauung abhängt, ob der Inhalt des obersten Dünndarmes 80 bis 95 oder blofs 30 bis 45 Proz. seines Stickstoffes in Form von Albumosen, umgekehrt nur 5 bis 20 oder aber 55 bis 70 Proz. in Form von Endprodukten enthält. Ebenso ist klar, dafs aus dem quantitativen Verhältnis von Albumosen, Pepton und Endprodukten an sich kein sicherer Schlufs darauf abzuleiten ist, in welcher Form die Resorption des verdauten Eiweifses vorwiegend erfolgt.

Befremdlich ist und in Widerspruch mit allen sonstigen Angaben die Beobachtung von Kutscher und Seemann, wonach Albumosen und Peptone im Dünndarminhalt in gar so geringer, nicht nennenswerter Menge, oft bis zum Fehlen der Biuretreaktion, auftreten sollen.

C. Dritte Versuchsreihe.

Darreichung von gekochtem Fleisch mit Fleischbrühe.

Pawlow†) hat gezeigt, dafs die Extraktivstoffe des Fleisches kräftige Erreger der Magensaftabsonderung sind. Es war daher denkbar, dafs die Verdauung von gekochtem Fleisch im Magen anders verläuft, wenn die Tiere es allein bekommen, als wenn ihnen mit dem Fleische die zugehörige Fleischbrühe gereicht wird.

---

*) A. L. Gillespie, loc. cit., S. 10.

**) A. Capparelli, Atti dell' Accad. Gioenia di sc. nat. in Catania, 4. R., 12 (1899) [in der Münch. mediz. Wochenschr. 46, 946 (1899)].

***) Fr. Kutscher und J. Seemann, Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 528 (1902).

†) J. P. Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen, Wiesbaden 1898, J. F. Bergmann, S. 126.

In nachfolgender Tabelle III sind die Ergebnisse einer Versuchsreihe zusammengestellt, bei welcher die Tiere 500 g gekochtes Fleisch und die dazu gehörige Fleischbrühe erhielten. 2, 4, 6, 8 oder 10 Stunden nach der Mahlzeit wurde das Versuchstier getötet. Der Mageninhalt und der Inhalt des ersten Teiles des Dünndarms wurde dann genau in derselben Weise wie in den früheren Versuchen untersucht.

Nach 2 Stunden enthielt der Dünndarm nur einen äufserst spärlichen Belag, in welchem Albumosen und durch Phosphorwolframsäure fällbare Stoffe vorhanden waren, aber keine echten Peptone. Der Mageninhalt hatte dasselbe Aussehen wie bei den Hunden, welche nur Fleisch allein erhalten hatten. Nach 10 Stunden war jedoch der Mageninhalt fast vollständig flüssig und nur in relativ geringer Menge vorhanden.

Tabelle III.

Versuchshund	Gewicht in Grammen	Verdauungsdauer in Stunden	Untersuchter Teil des Verdauungsapparates	Proz. N. enthalten in				Biuretreaktion im albumosenfreien Filtrat
				den Albumosen	den anderen Verdauungsprodukten			
					durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge	
Q	6800	2	Magen	82,26	4,99	12,75	17,74	negativ
R	5500	4	Magen	86,99	1,36	11,65	13,01	positiv
			Darm	10,04	7,08	82,88	89,96	negativ
S	7600	6	Magen	82,32	1,54	16,14	17,68	negativ
			Darm	33,96	14,35	51,69	66,04	negativ
T	8200	8	Magen	73,41	2,41	24,18	26,59	positiv
			Darm	3,56	35,06	61,50	96,42	negativ
U	7900	10	Magen	86,26	2,03	11,71	13,74	positiv
			Darm	26,70	5,61	67,69	73,30	positiv

Vergleicht man die in dieser Tabelle mitgeteilten Ergebnisse mit denen der Tabellen I und II, so sieht man, dafs, während bei den Hunden, welche das gekochte Fleisch ohne Fleischbrühe erhalten hatten, im Mageninhalte 79,31 bis 98,57 Proz. des gelösten nicht koagulablen Stickstoffes und im Dünndarminhalte 32,20 bis 94,92 Proz. in Gestalt von Albumosen sich befanden, bei den Tieren, welche mit dem gekochten Fleische zugleich die Fleischbrühe erhielten, im Mageninhalte 73,41 bis 86,99 Proz. des Stickstoffes und im Dünndarminhalte 3,56 bis 33,96 Proz. als Albumosen vorhanden waren. Die Zufügung der Fleischbrühe, bezw. der

darin enthaltenen Extraktivstoffe scheint also eine geringe Verminderung der relativen Albumosenmenge im Mageninhalte und eine bedeutende Verminderung der relativen Albumosenmenge im Dünndarminhalte zu veranlassen.

Es könnte dies die Folge einer Änderung in der Magen- und Pankreassekretion sein. Doch darf nicht übersehen werden, dafs die gleichzeitige Zufuhr von Flüssigkeit auch andere Bedingungen der Verdauung, so die Bewegung des Mageninhalts und namentlich seinen Übertritt in den Dünndarm in noch nicht zu übersehender Weise beeinflussen kann.

D. Die Bildung von krystallinischen Verdauungsprodukten im Magen.

Bekanntlich haben in jüngster Zeit ausgeführte Untersuchungen, so jene von Lawrow*) und Langstein**), die Angabe Hoppe-Seylers***) bestätigt, dafs die peptische Eiweifsspaltung schliefslich bis zur Bildung krystallinischer Produkte fortschreitet. Damit ist freilich noch nicht dargethan, dafs eine derartige weitgehende Zerlegung auch innerhalb der physiologischen Verhältnisse, d. h. innerhalb der relativ kurzen Zeit erfolgt, welche das Nahrungseiweifs im Magen verweilt.

Ich habe darum den Mageninhalt und zum Vergleich den Dünndarminhalt des Hundes M auf die Anwesenheit krystallinischer Spaltungsprodukte der Eiweifskörper untersucht. Zu diesem Zwecke wurde das nach Ausfällung durch Phosphorwolframsäure erhaltene Filtrat durch Barytwasser von Phosphorwolframsäure und Schwefelsäure befreit, der überschüssige Baryt zuerst durch Einleiten von Kohlensäure und nachher durch Hinzufügung sehr verdünnter Schwefelsäure quantitativ ausgefällt. Die nach Entfernung des Baryts erhaltenen klaren Lösungen wurden im Vakuum bei einer 40° nicht übersteigenden Temperatur zum Sirup eingeengt und dann in der Kälte stehen gelassen.

Aus dem Mageninhalt wurde so eine sehr spärliche Menge, aus dem Dünndarminhalt eine gröfsere Menge Krystallbrei erhalten. In beiden Proben fanden sich bei der mikroskopischen Untersuchung Leucinkugeln, Tyrosinnadeln, kleine gelbliche Krystallrosetten und Tropfen einer ölartigen schwarzbraunen Flüssigkeit von anscheinend ziemlich hohem spezifischen Gewicht. Im Magen-

*) D. Lawrow, Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 513 (1899), **33**, 312 (1901).
) L. Langstein, diese Beiträge **1, 507 (1902), **2**, 229 (1902).
***) F. Hoppe-Seyler, Physiol. Chemie, Berlin 1878, Hirschwald, **2**, 228.

inhalt war vorwiegend Leucin, im Dünndarminhalt Tyrosin und das schwarzbraune Öl vorhanden.

Die genauere Untersuchung ermöglichte es bisher nur, in der aus dem Magen stammenden Probe neben anderen krystallinischen Produkten, über die ich ein andermal berichten will, Leucin und Tyrosin sicher nachzuweisen. Das Leucin konnte durch die Form der Ausscheidung, die Scherersche Reaktion und den Stickstoffgehalt (gefunden: 10,41 Proz., berechnet: 10,69 Proz.), das Tyrosin durch Löslichkeitsverhältnisse, Krystallform, Millonsche und Piriasche Reaktion identifiziert werden.

Dieser Befund kann eine physiologische Tragweite nur für den Fall beanspruchen, als sich beweisen läſst, daſs die gefundenen krystallinischen Produkte durch die Einwirkung von Pepsin und Pseudopepsin entstanden, nicht aber schon im Fleisch vorgebildet enthalten sind. Der letztere Verdacht war aber um so weniger zurückzuweisen, als die Erfahrungen von R. Vogel*) über Autolyse des Fleisches gelehrt haben, daſs die chemische Veränderung desselben sehr bald nach dem Schlachten einsetzt.

In der That erhielt ich bei Verarbeitung von 500 g Rindfleisch, das wie in den Fütterungsversuchen etwa 5 bis 6 Stunden nach dem Schlachten abgekocht wurde, eine geringe, aber sicher nachweisbare Menge von Tyrosin (etwa 0,1 g), jedoch kein Leucin.

Ich muſs mir vorbehalten, die Entscheidung dieser für die Auffassung der Magenfunktion nicht ganz unwichtigen Frage durch weitere Versuche anzustreben.

2. Die Resorption der Verdauungsprodukte im Magen nach Einbringung von Gemengen derselben.

Wie oben dargelegt, ist die nach Fleischeinfuhr im Magen befindliche Verdauungslösung in allen Stadien durch das starke Überwiegen der Albumosen, das Fehlen oder äuſserst spärliche Vorkommen von Peptonen, den geringen Gehalt an sonstigen Verdauungsprodukten charakterisiert. Nun ist die Zusammensetzung des flüssigen Mageninhalts von einer ganzen Anzahl von Bedingungen abhängig: 1. von der Menge und Zusammensetzung des hinzutretenden Speichels und Magensekrets, 2. von der Intensität der fermentativen Wirkung des Magensaftes, 3. von dem Abfluſs der verflüssigten Anteile in das Duodenum, 4. von der Resorption seitens der Magenwand.

*) R. Vogel, Deutsch. Arch. f. klin. Med. 72, 291 (1902).

Unter diesen Bedingungen dürfte die erstangeführte wegen des geringen Gehalts des Speichels und Magensekrets an nicht koagulablen stickstoffhaltigen Bestandteilen auf die Bestimmung der gefundenen Verdauungsprodukte nur geringen Einflufs haben. Betreffs der übrigen Bedingungen haben schon C. A. Ewald und Gumlich*) hervorgehoben, dafs der geringe Gehalt des Magens an Peptonen nicht wohl auf ein Übertreten derselben in den Dünndarm zu beziehen sei, da ein Zurückbleiben der ebenso gut in Lösung befindlichen Albumosen nicht verständlich wäre. Es bleibt nach ihnen somit nur die Möglichkeit, entweder, dafs im Magen Pepton nur in sehr geringem Umfang gebildet wird, weil die einmal in Lösung gebrachten Eiweifsstoffe nicht lange genug im Magen verweilen, oder aber, dafs das Pepton, wenn einmal gebildet, rascher als die Albumosen von der Schleimhaut resorbiert wird. Ewald und Gumlich neigen der ersteren Vorstellung zu auf Grund der bekannten Thatsache, dafs es bei künstlicher peptischer Verdauung beträchtlicher Zeit bedarf, um merkliche Mengen von echtem Pepton zu bilden.

Um den Einflufs dieser beiden Bedingungen auf die Zusammensetzung des Mageninhalts kennen zu lernen, habe ich einige Versuche an Hunden angestellt, denen ich Gemenge peptischer Verdauungsprodukte verabreichte.

Zu diesem Zwecke dienten entweder 2proz. Witte-Peptonlösungen oder auch Lösungen, welche durch die peptische Verdauung eines reinen Eiweifsstoffes während einer bestimmten Zeit erhalten worden waren. In allen diesen Lösungen wurde natürlich im voraus die Verteilung des Stickstoffes zwischen den verschiedenen Fraktionen der eingebrachten Albumosenlösung ermittelt.

Die Versuche wurden ausgeführt: 1. am intakten Tier; 2. unter Behinderung des Übertritts von Mageninhalt in den Dünndarm. Obgleich die Ergebnisse dieser Untersuchungen keine entscheidende Beantwortung der gestellten Frage ermöglicht haben, so haben sie doch einige bemerkenswerte Thatsachen ergeben.

A. Versuche an normalen Tieren.

Da die Tiere die Aufnahme der Albumosenlösungen meist verweigerten, wurden sie ihnen mittels Sonde eingeführt. Nur selten wurde der Versuch durch nachträgliches Erbrechen vereitelt.

In den ersten Versuchen wurde nach einer gegebenen Zeit der Mageninhalt mittels Sonde ausgehebert und der Magen einige Male mit bekannten Volumen destillierten Wassers nachgespült. Dieses Verfahren

*) C. A. Ewald und Gumlich, loc. cit.

Tabelle IV.

Art der Gewinnung	In den Magen eingeführte Lösung: Stickstoffmenge in 10 ccm der Flüssigkeit in g	Proz. Stickstoff enthalten in den Albumosen	Proz. Stickstoff enthalten in den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge	Versuchshund	Gewicht in g	In den Magen eingeführte Flüssigkeitsmenge in ccm	In den Magen eingeführte Stickstoffmenge in g
Während 9 Tage der peptischen Verdauung unterworfenes Kasein	0,02793	43,58	14,50	41,92	56,42	Q	3800	180	0,50274
								200	0,55860
								200	0,55860
								200	0,55860
								180	0,50274
Während 6 Tage der peptischen Verdauung unterworfenes krystallisiertes Eieralbumin	0,02432	47,25	6,91	45,84	52,75	R	4350	180	0,43776
								200	0,48640
								180	0,43776
								200	0,48640
Während 4 Tage der peptischen Verdauung unterworfenes Kasein	0,02345	60,71	6,80	32,49	39,29	S	7600	200	0,46900
								200	0,46900
								200	0,46900
Witte-Pepton (Fibrin)	0,07862	58,24	19,92	21,84	41,76	T	6400	200	1,57240
						U	6800	180	1,41516
						V	6100	200	1,57240
						W	5900	200	1,57240
						X	6300	200	1,57240
						Y	7600	195	1,53309
						Z	7900	200	1,57240
Während 6 Tage der peptischen Verdauung unterworfenes Serumglobulin	0,01757	47,70	6,57	45,73	52,30	AA	4700	200	0,35140
						BB	4800	200	0,35140
						CC	3950	190	0,33383

hat den Vorteil, dafs man mit ein und demselben Tiere mehrere Versuche anstellen kann, hat aber auch einige Nachteile. Zuvorderst ist es nicht absolut sicher, dafs es den gesamten Inhalt des Magens auszuhebern gelingt, sodann bedingt das mehrfache Auswaschen eine gröfsere Unsicherheit in der Abschätzung der im Magen vorhandenen Flüssigkeitsmenge.

Deshalb wurde bei anderen Versuchen das Tier durch Chloroform

Verweildauer der Flüssigkeit im Magen in Stunden	Verwendetes Verfahren, um den Mageninhalt zu erhalten	Im Magen wiedergefunden							Inhalt des ersten Teiles des Dünndarms, Proz. des Stickstoffs enthalten in			
		Flüssigkeitsmenge in ccm	Stickstoffmenge		Proz. Stickstoff enthalten in				den Albumosen	den anderen Verdauungsprodukten		
			in 10 ccm der Lösung in g	gesamte, im Magen vorhandene in g	den Albumosen	den anderen Verdauungsprodukten				durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge
						durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge				
$^1/_2$	Ausspülung	80	0,02485	0,19880	45,52	19,64	34,84	54,48	—	—	—	—
1	„	110	0,02674	0,29414	63.06	14,93	22,01	36,94	—	—	—	—
$1^1/_2$	„	60	0,01547	0,09282	53,07	17,42	29,51	46,93	—	—	—	—
2	„	70	0,01383	0,09681	64,60	9.52	25,88	35,40	—	—	—	—
2	Autopsie	50	0,01059	0,05295	56,14	7,98	35,88	43,86	—	—	—	—
$^1/_2$	Ausspülung	85	0,01968	0,16728	55,61	7,23	37,16	44,39	—	—	—	—
1	„	70	0.01434	0,10038	59,38	5,58	35,04	40,62	—	—	—	—
$1^1/_2$	„	45	0,01503	0,06763	67,03	4,12	28,85	32,97	—	—	—	—
2	Autopsie	50	0,01450	0,07250	79,73	3,03	17,24	20,27	—	—	—	—
1	Ausspülung	95	0,01910	0,18145	75,24	4.82	19,94	24,76	—	—	—	—
$1^1/_2$	„	100	0.01786	0,17860	70.85	5,18	23,97	29,15	—	—	—	—
2	Autopsie	75	0,01543	0,11562	77,63	3,96	18,41	22,37	—	—	—	—
$^1/_2$	„	115	0,06474	0,74451	60,13	26,66	13,21	39,82	—	—	—	—
1	„	90	0,05062	0,45558	68,08	16,95	14,97	31,92	72,27	25,81	1,92	27,73
1	„	75	0,05982	0,44865	61,31	18,67	20,02	38,69	55,06	35,08	9,86	44,94
1	„	10	0,04614	0,04614	—	—	—	—	—	—	—	—
$1^1/_2$	„	55	0,04350	0,23925	63,33	17,86	18.81	36,67	38,89	43,02	18,09	61,11
$1^1/_2$	„	15	0,03510	0,05310	—	—	—	—	—	—	—	—
2	„	75	0,03741	0,28057	64,03	16,58	19,39	35,97	77,18	10,71	12,11	22,82
1	„	85	0,01564	0,13294	64,20	4,98	30,82	35,80	—	—	—	—
$1^1/_2$	„	115	0,01333	0,15329	79,85	3.13	17,00	20,13	81,24	5,70	13,06	18,76
2	„	40	0,01190	0,04760	82,19	2,21	15,60	17,81	66,22	16,80	16,98	33,78

nach Ablauf der im voraus bestimmten Zeit getötet und der Mageninhalt dem beiderseits unterbundenen Magen entnommen.

Der Verlauf der weiteren Untersuchung war der bereits beschriebene.

In der vorstehenden Tabelle (IV) finden sich die ermittelten Zahlen zusammengestellt. Bei einigen Hunden habe ich die Unter-

suchung auch auf den Inhalt der obersten 50 cm Dünndarm ausgedehnt.

Der Mageninhalt enthielt immer echte Peptone, aber nie Acidalbumin. Im obersten Teile des Dünndarms waren weder Acidalbumin noch echte Peptone vorhanden.

Von den Ergebnissen, die sich aus den erhaltenen Zahlen ableiten lassen, seien nachstehende hervorgehoben.

1. Entsprechend dem Umstand, dafs beim normalen Tier dem Übertritt der Flüssigkeit in das Duodenum nichts im Wege steht, hat sich in allen Fällen das Gesamtvolum der eingebrachten Lösung vermindert. Dafs es sich blofs um eine Verminderung durch Resorption gehandelt hat, ist auf Grund der bekannten Thatsachen *), welche einen Übertritt flüssigen Mageninhalts durch den Pförtner beweisen, ausgeschlossen. Darauf dürfte auch zu beziehen sein, dafs ich im Darminhalt in jenen Fällen, wo ich ihn mindestens eine Stunde nach der Einflöfsung der Lösung untersuchte, stets eine mehr oder minder bedeutende Menge einer gelblichen, sehr dicken, schleimähnlichen Flüssigkeit vorfand, während ich sie nach halbstündiger Versuchsdauer vermifste.

2. Die im Magen wiedergefundene gesamte Stickstoffmenge ist bedeutend geringer als die eingeführte. Gewöhnlich ist sie um so kleiner, je länger der Versuch dauert, doch besteht kein festes Verhältnis zwischen Stickstoffabnahme und Versuchsdauer. Auch der prozentische Stickstoffgehalt des Mageninhalts vermindert sich. Dafs diese Abnahme nicht ausschliefslich Folge einer Verdünnung durch den zuströmenden Magensaft sein kann, geht aus den sofort zu besprechenden Veränderungen in der Zusammensetzung der eingebrachten Lösung hervor.

3. Der relative Gehalt der eingebrachten Lösung an Albumosen nimmt während des Verweilens im Magen zu, während der Gehalt an den anderen Bestandteilen abnimmt.

4. Die relative Menge der durch Phosphorwolframsäure fällbaren nicht albumosenähnlichen Stoffe erfährt im Beginn eine Erhöhung gegenüber der eingeflöfsten Lösung, hinterdrein eine Erniedrigung. Doch ist auch hier eine feste Proportionalität zur Dauer des Verweilens im Magen nicht zu erkennen.

5. Die Zusammensetzung des Inhaltes des obersten Teiles des Dünndarms ist von der des Mageninhaltes ziemlich verschieden.

---

*) Man vergl. Untersuchungen von W. Busch, J. von Mering, A. Hirsch u. s. f.

Bald ist die relative Albumosenmenge gröfser, bald kleiner als im Magen. Meistens findet man im ersten Teile des Dünndarmes mehr nicht albumosenähnliche Produkte, welche durch Phosphorwolframsäure gefällt werden, und weniger solche, welche nicht gefällt werden, als im Magen.

Da der zuströmende Magensaft, falls er, wie zu erwarten, eine verdauende Wirkung äufsert, nur eine Verminderung der Albumosen und Vermehrung der übrigen Verdauungsprodukte bewirken könnte, der Versuch aber übereinstimmend das entgegengesetzte Verhalten ergiebt, so ist kaum ein anderer Schlufs möglich, als dafs die Magenwand die Albumosen langsamer als die anderen Produkte (oder doch einen Teil dieser Produkte) aufnimmt. Für eine nachträgliche Umwandlung der eingebrachten Albumosen in solche leichter resorbierbare Stoffe durch die Wirkung des Magensaftes spricht direkt die unter 4 angeführte vorübergehende Zunahme der durch Phosphorwolframsäure fällbaren Peptone und Endprodukte.

B. Versuche an Tieren mit Pylorusverschlufs.

Die Anordnung der Versuche war folgende:

Bei einem 8 bis 11 kg schweren Hund wird in vorsichtiger Äthernarkose nach Abscheren und sorgfältiger Desinfektion der Bauchhaut die Bauchhöhle durch einen 1 oder 2 cm rechts von der Linea alba geführten, 15 bis 20 cm langen, 1 bis 2 cm unter dem Rippenbogen beginnenden Einschnitt geöffnet. Dann unterbindet man die Speiseröhre unmittelbar über der Cardia, ohne die grofsen Gefäfse der Magenoberfläche zu verletzen, bringt 2 Fäden unter das Duodenum und öffnet es durch einen Längsschnitt. Dieser Einschnitt mufs lang genug sein, um die Einführung eines in der Mitte durchbohrten Gummistopfens zuzulassen. In der Bohrung steckt eine 25 bis 30 cm lange Gummisonde, welche den Stopfen ungefähr 5 cm lang überragt, so dafs ihr inneres Ende sich im Magen befindet, wenn der Stopfen am Pförtner sitzt. Der andere Teil der Sonde mifst wenigstens 15 cm und ist 5 cm von seinem äufseren Ende mit einer Schraubenklemme versehen. Durch den Einschnitt der Duodenalwand und den Pylorus führt man die Sonde in den Magen und bringt dann den Stopfen bis an den Pförtner, wo er mit Hülfe der unter das Duodenum gelegten Bindfäden befestigt wird. Es ist darauf zu achten, dafs während der Operation kein Blut in den Magen gelangt. Nach der Operation verschliefst man die Bauchhöhle, indem man die Sonde durch eine kleine Öffnung nach aufsen leitet. Die Wunde wird mit Watte bedeckt gehalten und das Tier in öfters erneuerte erwärmte Decken gehüllt. Die Operation bedarf keiner halben Stunde und vollzieht sich ohne sonstige Blutung als der aus den kleinen Gefäfsen der Bauchwand*).

*) Herr Dr. H. Vindevogel hatte die Güte, mir bei diesen Versuchen Hülfe zu leisten, wofür ich ihm auch an dieser Stelle bestens danke.

Tabelle

In den Magen eingeführte Lösung						Versuchshund
	Stickstoffmenge in 10 ccm der Flüssigkeit in Grammen	Proz. N. enthalten in				
		den Albumosen	den anderen Verdauungsprodukten			
			durch Phosphorwolframsäure fällbar	durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Gesamtmenge	
Witte-Pepton (Fibrin)	0,02615	51,53	29,14	19,33	48,47	DD, EE
Während 9 Tage der peptischen Verdauung unterworfenes Kasein	0,02793	43,58	14,50	41,92	56,42	FF
Während 20 Stunden der peptischen Verdauung unterworfenes krystallisiertes Eieralbumin	0,03680	74,76	1,22	24,02	25,24	GG, HH
Witte-Pepton (Fibrin)	0,04778	58,47	25,05	16,48	41,53	II, KK

1 oder 2 Stunden nach der Operation versieht man die Sonde mit einem Trichter und giefst in dieselbe 400 bis 500 ccm einer Albumosenlösung von bekanntem Gehalt. Man schliefst dann rasch die Klemme derart, dafs die Sonde gefüllt bleibt. Der Einlauf der Flüssigkeit in den Magen geht sehr leicht vor sich.

Nach 1, nach $1^1/_2$ und nach 2 Stunden werden je ungefähr 100 ccm des Mageninhaltes aufgefangen. Dafür genügt es, die Klemme los-

Flüssigkeitsmenge in Kubikcentimetern	Dauer des Verbleibens der Flüssigkeit im Magen in Stunden	Aus dem Magen entnommene Lösung: Flüssigkeitsmenge in Kubikcentimetern	Aus dem Magen entnommene Lösung: Stickstoffmenge in 10 ccm der Flüssigkeit in Grammen	Proz. N. enthalten in den Albumosen	Proz. N. enthalten in den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure fällbar	Proz. N. enthalten in den anderen Verdauungsprodukten: durch Phosphorwolframsäure nicht fällbar	Proz. N. enthalten in den anderen Verdauungsprodukten: Gesamtmenge	Gesamte Flüssigkeitsmenge (aus dem Magen entnommene, in der Sonde enthaltene, bei der Autopsie gefundene)
500	1	100	0,02530	58,23	32,18	9,59	41,47	470
	1½	110	0,02340	78,40	16,31	5,29	21,60	
	2	110	0,02131	71,49	19,21	9,30	28,51	
425	1	110	0,02376	47,49	27,12	25,39	52,51	410
	1½	95	0,02161	34,74	30,12	35,14	65,26	
	2	100	0,02030	24,35	32,97	42,68	75,65	
480	1	110	0,02492	55,90	25,94	18,16	44,10	46[illegible]
	2	120	0,02075	58,72	32,45	8,83	41,28	
500	1	100	0,03284	57,98	11,22	30,90	42,02	540
	1½	100	0,03148	55,55	10,40	34,05	44,45	
	2	120	0,03006	52,25	13.34	34,41	47,75	
450	1	110	0,03176	51,31	15,80	32,89	48,69	490
	1½	105	0,03403	50,51	14,79	34,70	49,49	
	2	115	0,03142	47,76	15,57	36,67	52,24	
500	1	105	0,04750	45,26	34,36	20,28	54,74	525
	1½	110	0,04666	42,51	40,39	17,10	57,49	
	2	105	0,04153	44,35	34,43	21,22	55,65	
500	1	110	0,04606	47,14	33,45	19,41	52,86	515
	1½	100	0,04502	45,56	30,07	24,37	54,44	
	2	120	0,04078	33,23	37,88	28,89	66,77	

zuschrauben; nur ist es nötig, zunächst ungefähr 20 ccm Flüssigkeit abfließen zu lassen, was die in der Sonde verbliebene Menge übertrifft. Man ist dann sicher, daß die aufgefangene Flüssigkeit wirklich aus dem Magen herrührt.

Der Hund wird nachher rasch durch Chloroform getötet. Die noch im Magen verbliebene Flüssigkeit wird mit der nötigen Vorsicht aufgefangen, wobei man sich auch dessen versichert, daß die Operation

richtig ausgeführt wurde, und besonders dafs der Magen unverletzt blieb.

Um den Betrag der Magenresorption schätzen zu können, wurden sämtliche während des Versuchs entnommenen Flüssigkeitsmengen und das bei der Autopsie des Hundes im Magen vorgefundene Flüssigkeitsvolum addiert.

Man bestimmt alsdann den Stickstoffgehalt und die relative Albumosenmenge jeder der während des Verdauungsprozesses aufgefangenen Proben in derselben Weise wie in den früheren Versuchsreihen.

Die entnommenen Proben enthielten sämtlich Peptone.

Die im letzten Stab der Tabelle angeführten Zahlen zeigen, dafs die im Magen wiedergefundene Flüssigkeitsmenge in vier Fällen gröfser, in drei Fällen etwas kleiner war als die ursprünglich eingeführte. Diese Veränderungen sind bedingt durch zwei einander entgegenwirkende Vorgänge, Resorption von Wasser und Zuflufs von Magensaft. Der Gesamtstickstoff des Inhalts erfährt in allen Versuchen eine schliefsliche Abnahme, auch wo eine Flüssigkeitszunahme nachweisbar ist, woraus hervorgeht, dafs in allen Fällen eine Resorption stickstoffhaltiger Substanz, wenn auch nur in geringem Umfang, stattgefunden hat.

Da ich von dem Mageninhalt wiederholt Anteile zur Untersuchung entnahm, so ist es nicht möglich, ganz genau zu berechnen, wieviel Stickstoff derselbe zu Ende des Versuches enthalten hätte. Man kann aber den Stickstoffgehalt des Mageninhalts nach einstündiger Versuchsdauer und am Schlusse des Versuchs (bei Berechnung auf die Gesamtflüssigkeit) zur Grundlage einer Schätzung machen. Die berechneten Zahlen sind in Tabelle VI nebeneinander gestellt.

Tabelle VI.

Versuchs-hund	Gesamtstickstoffmenge		
	in den Magen eingeführt in Grammen	des Mageninhaltes am Ende des Versuches, in Grammen berechnet, nach dem Stickstoffgehalt	
		nach 1 Stunde	nach 2 Stunden
DD	1,3075	1,1891	1,0016
EE	1,1114	0,9742	0,8323
FF	1,3406	1,1463	0,9545
GG	1,8400	1,7734	1,6232
HH	1,6560	1,7032	1,5395
JJ	2,3890	2,4937	2,1803
KK	2.3890	2.3721	2,1002

Wie ersichtlich, ergiebt sich aus den Bestimmungen am Ende des Versuches übereinstimmend eine Abnahme des zurückgehaltenen Stickstoffs in annähernd gleicher Höhe (0,15 bis 0,31 g). Auch aus den nach einstündigem Verweilen erhaltenen Zahlen ist, mit Ausnahme der Versuche HH und JJ, eine Abnahme des Gesamtstickstoffs zu entnehmen.

Die thatsächlich erfolgte Resorption dürfte etwas gröfser sein, als die gefundenen Zahlen besagen, da der Stickstoffgehalt des hinzugekommenen Magensafts nicht in Rechnung gebracht ist.

Die prozentische Zusammensetzung des Mageninhalts an Albumosen und den übrigen stickstoffhaltigen Bestandteilen erfährt bei fünf Versuchstieren eine Änderung im Sinne einer Abnahme der Albumosen und Zunahme der entfernteren Verdauungsprodukte. Nur bei Hund DD und FF findet sich das entgegengesetzte Verhalten. Dabei steigt in allen Fällen (bei DD allerdings nur vorübergehend) der Gehalt an durch Phosphorwolframsäure fällbaren, nicht albumosenähnlichen Substanzen, zumeist auch — Versuch FF (Kasein) bildet da eine besonders auffällige Ausnahme — an den nicht durch Phosphorwolframsäure fällbaren.

Wie man sieht, gestattet dieses Ergebnis keinen einfachen Schlufs. Daran trägt zum Teil die Verwendung verschiedener Eiweifsstoffe (Fibrin, Eieralbumin, Kasein) Schuld, deren Verdauungsprodukte (welche überdies sehr verschiedenen Verdauungsstadien entsprechen) in betreff des Verhaltens zu Magensaft und bei der Resorption gewifs Verschiedenheiten aufweisen. Immerhin lassen sich die Befunde im ganzen dahin deuten, dafs die Zusammensetzung der im Magen verweilenden Albumosenlösung zwei nebeneinander einhergehenden, sich in ihrem Ergebnis kreuzenden Einflüssen unterliegt: der verdauenden Wirkung des Magensafts auf die Albumosen und der Resorption. Die peptische Spaltung vermindert notwendig die Menge der Albumosen und vermehrt jene der übrigen Verdauungsprodukte, während die Resorption nach dem früher Ermittelten vorwiegend die Menge der letzteren herabsetzt. Erfolgt der Abbau der Albumosen so rasch, dafs die Resorption nicht Schritt halten kann, so kommt es zu dem am häufigsten beobachteten Ergebnis: Verminderung des Albumosengehalts, Zunahme der übrigen Produkte. Überwiegt die Resorption, so kann das Umgekehrte erfolgen. Vielleicht ist es kein Zufall, dafs die zwei Versuche (DD und FF), welche eine Anreicherung an Albumosen aufweisen, zu denjenigen gehören (DD, EE, FF), bei denen eine Abnahme des Flüssigkeitsvolums, vermutlich daher eine lebhafte Resorption vorlag.

Dieser Deutungsversuch geht von der Voraussetzung aus, dafs die Albumosen von dem Magensaft rascher, als man bisher annahm, zu Peptonen und weiteren Produkten umgewandelt werden. Doch sprechen alle neueren Erfahrungen dafür, dafs man die spaltende Wirkung des Magensafts auf Grund der in vitro mit Pepsin (bei Abwesenheit von Pseudopepsin) ausgeführten Versuche zu niedrig eingeschätzt hat.

C. Vergleich der Resorption im Magen und Anfangsteil des Dünndarmes.

Die für diese Versuche verwendeten Hunde wurden auf die gleiche Art operiert wie jene, welche zu den in der Tabelle V zusammengestellten Versuchen gedient hatten. Aufserdem wurden bei diesen Tieren zwei Unterbindungen am Duodenum angelegt, eine definitive nahe beim Cöcum und eine provisorische am Duodenum in geringer Entfernung von der provisorisch den Pförtner absperrenden Ligatur. Durch eine im Duodenum zwischen den beiden provisorischen Unterbindungen angelegte Öffnung wird mittels einer mit Trichter und Klemme versehenen Sonde in den Magen und dann in den Dünndarm die gleiche Menge einer Lösung von Verdauungsprodukten eingebracht. Die Ligaturen werden im Moment des Herausziehens der Sonde zugezogen, so dafs Magen und Dünndarm endgültig abgeschlossen sind; dann wird die Bauchwunde verschlossen. Nach Ablauf einer bestimmten Zeit wird das Tier getötet und der Inhalt von Magen und Dünndarm für sich aufgefangen und zur Bestimmung des Stickstoffes benutzt.

Tabelle VII (S. 361) giebt eine Übersicht der erhaltenen Zahlen.

Aus diesen Zahlen geht neuerdings hervor, dafs im Magen eine Resorption erfolgt. Da auch hier die mit dem Magensaft zugeführte Menge Wasser und Stickstoff nicht in Rechnung gebracht ist, so sind die gefundenen Resorptionswerte sogar etwas kleiner, als der Wirklichkeit entspricht. Die im Darm erfolgte Resorption ist allerdings trotz sonst gleicher Bedingungen sehr viel gröfser. Da das aufserordentlich grofse Resorptionsvermögen der Dünndarmschleimhaut durch zahlreiche Versuche anderer Forscher festgestellt ist, liegt kein Grund vor, auf dieselbe näher einzugehen.

3. Schlufsbemerkungen.

Die von mir erhaltenen Resultate vervollständigen in einzelnen Punkten unsere Erfahrungen über Magenverdauung und Magenresorption. Zunächst seien die bereits vorliegenden Arbeiten, soweit sie Säugetiere betreffen und soweit sie nicht schon Berücksichtigung gefunden haben, kurz zusammengefafst.

Tabelle VII.

In den Magen und in den Dünndarm eingeführte Lösung	Stickstoffmenge in 10 ccm der Lösung, in Grammen	Versuchshund	Gewicht in Grammen	Zeit des Verweilens	Untersuchtes Organ	Eingeführt: Flüssigkeitsmenge in Kubikcentimetern	Eingeführt: Gesamtstickstoff in Grammen	Wiedergefunden: Flüssigkeitsmenge in Kubikcentimetern	Wiedergefunden: Stickstoffmenge in 10 ccm der Flüssigkeit, in Grammen	Wiedergefunden: Gesamtstickstoff in Grammen
12 Tage der peptischen Verdauung unterworfenes krystallisiertes Serumalbumin	0,03475	LL	12100	1	Magen	300	1,04250	370	0,02744	1,01528
					Darm	300	1,04250	140	0,01778	0,24892
9 Tage der peptischen Verdauung unterworfenes krystallisiertes Eieralbumin	0,02152	MM	11300	1½	Magen	200	0,43040	275	0,00800	0,22000
					Darm	200	0,43040	40	0,00642	0,02568
		NN	11200	2	Magen	200	0,43040	220	0,00975	0,21450
					Darm	200	0,43040	25	0,00646	0,01614

Tappeiner*) unterband bei einem nüchternen leicht chloroformierten Hunde den Pförtner und führte dann mittels einer Sonde 55,3 ccm einer wässerigen Lösung, welche 10,7 g Peptone (eigentlich durch Phosphorwolframsäure fällbare Produkte) enthielt, in den Magen ein. Nach drei Stunden fanden sich 60 ccm Flüssigkeit im Magen, also mehr als die eingeführte Menge. Die wiedergefundene Peptonmenge war 9,6 g. Demnach war Verdünnung des Mageninhaltes durch den Magensaft und eine geringe Resorption der Peptone eingetreten.

Bei zwei mit einer in der Nähe des Pförtners befindlichen Magen-

*) H. Tappeiner, Zeitschr. f. Biol. 16, 497 (1880).

fistel versehenen Hunden führte von Anrep*) in das Duodenum unterhalb des Pylorus einen Gummiballon ein, welcher aufgeblasen den Magen vom Duodenum abschlofs. Frisch bereitetes Syntonin, in den ausgespülten Magen nüchterner Tiere gebracht, gab nach $1^1/_2$ Stunden bezw. 1 Stunde 40 Minuten eine grofse Menge Albumosen und Peptone. Von Wittepepton wurden in 1 Stunde 40 Minuten bezw. 1 Stunde 45 Minuten 23,3 bis 33,9 Proz. resorbiert. Die Flüssigkeitsmenge nahm durch Zutritt von Magensekret zu.

Brandl**) brachte an einem nüchternen Hund mit Magenfistel nach Verschlufs des Pylorus durch einen Gummiballon „Grübler"-sches „Pepton" in 5- bis 20proz. Lösung in den Magen ein und bestimmte die Menge des resorbierten Anteils durch Stickstoffbestimmung der eingeführten und der nach zwei Stunden wiedergewonnenen Flüssigkeit. Dabei entfernte er den vom Magen herrührenden Schleim durch Fällung mit Essigsäure. Es gelangten 2,68 bis 13,26 Proz. des „Peptons" zur Resorption, weniger aus den verdünnten als aus den konzentrierten Lösungen. In allen Fällen erfuhr die Flüssigkeit durch den Magensaft eine sehr bedeutende Vermehrung.

von Mering***) beobachtete ebenfalls, dafs in den Magen von Hunden eingebrachte Witte-Peptonlösung verdünnt in das Duodenum abflofs. Nach Zufuhr von 300 ccm einer 20 proz. Witte-Peptonlösung erhielt er aus der Duodenalfistel 475 ccm einer blofs 12 proz. Lösung. Von den zugeführten 60 g des Albumosenpeptongemenges waren nur 3 g zur Resorption gelangt.

Gegen die absolute Genauigkeit der durch diese Versuche ermittelten Werte, ebenso wie auch gegen die von mir angewandte Methodik lassen sich mehr oder weniger begründete Einwände erheben.

Die Anlegung einer Magenfistel beeinträchtigt die Funktion der Magenschleimhaut. Wird der Ösophagus über der Cardia nicht ligiert, so besteht einerseits die Gefahr des Erbrechens, andererseits jene der Beimengung von Speichel †). Eine Ligatur des Ösophagus wie des Pylorus vermag dagegen die normale Innervation und Blutversorgung zu stören. Die Einführung von Sonden führt vielleicht zu einer stärkeren Magensaftsekretion ††).

---

*) B. von Anrep, Archiv f. Anatom. und Physiol., Physiol. Abt. 1881, S. 504.

**) J. Brandl, Zeitschr. f. Biol., N. F., 11, 277 (1892).

***) J. von Mering, Therapeut. Monatsh. 1893, S. 201; Verhandl. des XXII. Kongr. f. inn. Med. zu Wiesbaden, 1893.

†) von Bunge, Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie, 4. Auflage, Leipzig 1898, S. 167.

††) Nach P. Leconte [La Cellule 17, 283 (1900)] und Pawlow (loc. cit.) scheint die Einführung einer Sonde in den Magen keine Magensaftsekretion hervorzurufen.

Auch Narkose und Laparotomie können sekundär die Magenfunktionen beeinflussen*).

Man kann unbedenklich die Berechtigung dieser Einwände zugeben, ohne auf die Verwertung der mit den bemängelten Methoden erhaltenen Resultate verzichten zu müssen. Sieht man von groben und gut vermeidbaren Versuchsfehlern, z. B. Erbrechen, ab, so handelt es sich allenthalben um Momente, welche geeignet sind, die Leistung des Magens für die Verdauung (z. B. durch gestörte Innervations- und Zirkulationsverhältnisse und infolgedessen beeinträchtigte Sekretion) oder für die Resorption (z. B. durch Zufuhr von Wasser und stickstoffhaltigen Substanzen mit dem Speichel und Magensaft) zu verringern oder doch geringer erscheinen zu lassen, während keins dieser Momente etwa eine gesteigerte Leistung in diesen beiden Richtungen vortäuschen kann. Wenn die Versuche trotzdem übereinstimmend eine bestimmte Bedeutung des Magens für Verdauung und Resorption ergeben, so kann nur gefolgert werden, daſs diese Bedeutung beim intakten Magen zumindest ebenso groſs, vermutlich aber gröſser ist als unter den gesetzten Versuchsbedingungen.

Soweit die mitgeteilten Versuche über das Schicksal des in den Hundemagen eingeführten Fleisches ein Urteil gestatten, läſst sich nun folgendes darüber aussagen. Die geronnenen Eiweiſskörper des Fleisches — und die gleichen Verhältnisse dürften bei anderen Arten festen Nahrungseiweiſses gegeben sein — werden im Magen successive durch den Magensaft in Lösung gebracht, wobei sehr wenig Acidalbumin, sehr reichlich Albumosen, minder reichlich entferntere Verdauungsprodukte (Peptone, Peptoide, vielleicht auch krystallinische Endprodukte) entstehen. Der in Lösung gegangene Anteil wird zum gröſsten Teil an den Dünndarm abgegeben, wo er einer rapiden weiteren Spaltung und der Resorption verfällt. Ein geringer Teil gelangt schon im Magen zur Resorption, und zwar unterliegen dieser in erster Reihe die entfernteren

*) Da die Isolierung des Magens nach den von Frémont (s. in dem Berichte des dritten internationalen Physiologenkongresses zu Bern 1895 die Mitteilung von Herzen darüber) und von A. Frouin [Compt. rend. hebd. de sc. de la Soc. de Biolog., 11. Serie, 1, 397 (1899)] beschriebenen Verfahren einen Teil der Gefäſs- und Nervenverbindungen des Magens ausschaltet, so dürften auch diese Verfahren Einwänden Raum lassen. Die von Pawlow (loc. cit., S. 16) ersonnene Methode aber, durch welche ein nach auſsen mündender kleiner Magen gebildet wird, welcher funktionell ein richtiges Abbild des eigentlichen Magens darstellt [J. Lobassow, Arch. d. sc. Biolog. 5, 425 (1896), nach Pawlow zitiert], war für meinen Zweck nicht verwendbar.

Verdauungsprodukte, während die Albumosen schwieriger aufgenommen werden.

Dementsprechend enthält der flüssige Mageninhalt während des Verweilens des Fleisches im Magen stets bei weitem überwiegend Albumosen neben geringen Mengen der entfernteren Verdauungsprodukte. Unter den vorhandenen Albumosen finden sich primäre und sekundäre. Ein bestimmtes Verhältnis der einzelnen Fraktionen ist nicht gegeben. Peptone sind stets nur in sehr geringer Menge vorhanden oder fehlen ganz; hingegen werden die nicht Biuretreaktion gebenden Produkte nie vermifst.

Wenn man nicht annehmen will, dafs der geringe Gehalt an Peptonen durch eine besondere selektive Resorption der Peptone seitens der Magenschleimhaut veranlafst wird, so gelangt man zu dem Schlusse, dafs ihnen keine besondere Bedeutung für die Resorption zukommt, wie dies schon anderseitig, z. B. von Ewald und Gumlich, betont worden ist. In der That unterscheiden sich diese relativ einfach gebauten Stoffe von den Vorstufen der Amidosäuren, den „Peptoiden“, vielleicht nur durch ihre Fähigkeit, die Biuretreaktion zu geben, und es ist nicht ausgeschlossen, dafs beiden Gruppen von Stoffen (Peptonen und Peptoiden) die gleiche physiologische Bedeutung zukommt. Soweit eine Resorption der Verdauungsprodukte des Eiweifses im Magen erfolgt, betrifft sie, nach den Mengenverhältnissen zu schliefsen, vorwiegend die nicht mehr die Biuretreaktion gebenden Produkte, obgleich die Thatsache, dafs die resorbierende Magenschleimhaut Verdauungsprodukte vom Charakter der Albumosen enthält*), eine Aufnahme derselben seitens der Magenwand nicht gut bezweifeln läfst.

*) K. Glaefsner, diese Beiträge 1, 332 (1902).

XVII.

Über das Verhalten halogensubstituierter Toluole und der Amidobenzoesäuren im Organismus.

Von Dr. med. **Herm. Hildebrandt.**

Preufse*) hat nachgewiesen, dafs p-Bromtoluol im Organismus des Hundes zu der entsprechenden p-Brombenzoesäure oxydiert wird, die sich aber zum gröfsten Teile mit Glykokoll im Organismus paart und als Hippursäure ausgeschieden wird. Bezüglich des o-Bromtoluols hat Preufse keine näheren Untersuchungen angestellt, da sein Präparat nicht frei von der p-Verbindung war. Neuerdings ist o-Bromtoluol im Handel zu haben, nicht dagegen ein gutes Produkt von m-Bromtoluol. Hingegen sind die entsprechenden chlorsubstituierten Isomeren durch die Chemische Fabrik von Kahlbaum zu beziehen. Während über das Verhalten der Fluorbenzoesäuren Untersuchungen von Coppola**) vorliegen, welcher fand, dafs sie beim Hunde in die entsprechenden Hippursäuren übergehen, liegen in der Klasse der Chlorverbindungen nur betreffs des Verhaltens der m-Chlorbenzoesäure Untersuchungen vor. Vergleichende pharmakologische Versuche hinsichtlich des Verhaltens der halogensubstituierten Toluole beanspruchen aber schon darum ein Interesse, weil sich diese Körper gegen Oxydationsmittel in chemischer Hinsicht verschieden verhalten. Chromsäure oxydiert die m- und p-Halogentoluole zu den entsprechenden Karbonsäuren, sie verbrennt dagegen die Orthohalogentoluole vollständig. Beim Kochen mit verdünnter Salpetersäure, durch Kaliumpermanganat oder Ferricyan-

*) Zeitschr. f. physiol. Chemie 5, 57 ff. (1881).

**) Gazz. chim. it. 13, 522.

kalium werden alle Isomeren, auch die Orthoverbindungen, in Karbonsäuren übergeführt*).

Wenn man den nach Eingabe von halogensubstituierten Toluolen vom Kaninchen gelassenen Harn mit Salzsäure oder Schwefelsäure ansäuert und kocht, so kann man durch nachfolgendes Schütteln mit Äther mit Leichtigkeit die entsprechenden halogensubstituierten Benzoesäuren gewinnen. Auch nach Darreichung von p-Bromtoluol erhält man auf diese Weise nur die p-Brombenzoesäure.

Die Kondensationsprodukte mit Glykokoll werden meist als schwer spaltbar beschrieben. Bertagnini**) gewann nach Darreichung von Nitrobenzoesäure die entsprechende Hippursäure und bemerkt, dafs selbst 10 Minuten langes Erhitzen mit rauchender Salzsäure keine Zersetzung herbeiführte, dagegen einstündiges Kochen. O. Schultzen und C. Graebe***) fanden nach Einnahme von m-Chlorbenzoesäure die entsprechende Hippursäure im Harn und konnten ihr Kalksalz analysieren. Beilstein und Schlun hatten nach Darreichung der m-Chlorbenzoesäure beim Hunde diese unverändert im Harn wiedergefunden. Schultzen und Graebe erklären das abweichende Resultat damit, dafs im untersuchten Harne bereits eine Zersetzung eingetreten sei; es sei bekannt, dafs Hippursäuren unter dem Einflufs faulender und gärender organischer Substanzen sich weit leichter versetzen als durch Einwirkung von Mineralsäuren. Nach meinen Erfahrungen sind die halogensubstituierten Hippursäuren auch gegenüber verdünnten Mineralsäuren, namentlich Schwefelsäure und Salzsäure, ziemlich empfindlich. Wenn man nach Zusatz dieser Säuren den Harn ausäthert und behufs besserer Trennung der Ätherschicht mit Alkohol versetzt, so geht stets etwas Säure in die ätherische Lösung; beim Abdestillieren kann bereits eine Zersetzung der Hippursäuren erfolgen. Um diese Zersetzung zu vermeiden, bin ich derart verfahren, dafs ich den Harn der Tiere zunächst mit Ammoniak alkalisch machte und im Glaskolben etwa 5 Minuten kochte, wodurch er leichter durch Äther extrahierbar wird, nach dem Erkalten mit Phosphorsäure sauer machte und dann mit Äther ausschüttelte. Nunmehr erhielt ich stets stickstoffhaltige Säuren, die nach dem Absieden des Äthers auf Zusatz von Wasser auskrystallisierten, wenn ich bromsubstituierte Toluole in Tages-

*) Richter, Chemie d. Kohlenstoffverb., 9. Aufl., II B., S. 55.

**) Ann. Ch. u. Ph. 78, 100 ff. (1851).

***) Du Bois-Reymonds Arch. 1867; Annalen d. Chemie 142, 346 ff.

gaben von 2 g an mittelgroſse Kaninchen verfütterte. Chlorsubstituierte Toluole hingegen lieferten stets die ungepaarten entsprechenden Benzoesäuren. Ein ganz anderes Verhalten zeigte der Hund; hier wurden stets die chlorsubstituierten Toluole als Hippursäuren ausgeschieden.

A. Versuche am Hund.

1. Chlorsubstituierte Toluole.

Ein groſser Hund erhielt 5 g p-Chlortoluol in Gelatinekapseln. Aus dem am nächsten Tage gelassenen Harn habe ich die p-Chlorhippursäure isoliert; sie schmilzt bei 143°; die Analyse ergab Folgendes:

0,2024 g: 0,3693 CO_2, 0,074 H_2O.

Gefunden:	Berechnet für: $C_9H_8ClNO_3$ (+ H_2O)
C = 49,76 Proz.	C = 50,16 Proz.
H = 4,06 „	H = 4,64 „
N = 5,86 „	N = 6,06 „

Durch Kochen mit konzentrierter Salzsäure habe ich eine Spaltung herbeigeführt und erhielt die entsprechende p-Chlorbenzoesäure vom Sp. 235°.

Diese hat O. Emmerling*) erhalten durch Oxydation des p-Chlortoluols mittels Kaliumpermanganat, Beilstein und Geitner**) durch Einwirkung von Chromsäure auf p-Chlortoluol.

Nach Darreichung von Metachlortoluol beim Hunde erhielt ich eine nicht krystallinische Säure, die gleichfalls stickstoffhaltig und mit der von Schultzen und Graebe***) nach Einnahme von m-Chlorbenzoesäure und von Otto†) durch Einwirkung von Chlor auf Hippursäure dargestellten m-Cl-Hippursäure identisch ist. Beim Kochen mit starker Salzsäure konnte ich aus der m-Cl-Hippursäure leicht die m-Chlorbenzoesäure vom Sp. 152° gewinnen. Diese ist von Wróblewski††) aus m-Cl-Toluol mittels Chromsäuregemisch erhalten worden.

Orthochlortoluol geht im Organismus des Hundes gleichfalls in die entsprechende Hippursäure über. Auch diese

*) Berl. Ber. 8, 880.
**) Annalen d. Chemie 139, 336.
***) loc. cit.
†) Annalen d. Chemie 122, 129.
††) Daselbst 168, 156.

krystallisiert nicht; dagegen konnte ich ihr Kalksalz krystallinisch erhalten, dessen Verbrennung ergab:

0,2080 g : 0,0598 H_2O, 0,3512 CO_2.

Gefunden:	Berechnet für: $(C_9H_7ClNO_3)_2Ca$
C = 46,05 Proz.	C = 46,46 Proz.
H = 3,18 „	H = 3,01 „

Beim Kochen mit Salzsäure erhielt ich die o-Chlorbenzoesäure, Sp. 137°.

Zuerst hat sie Kekulé*) aus Salicylsäure dargestellt, Emmerling**) erhielt sie durch Oxydation des o-Chlortoluols mittels Kaliumpermanganat, Graebe***) aus der Anthranilsäure durch Austausch des Amids durch Chlor.

2. Bromsubstituierte Toluole.

Orthobromtoluol geht im Organismus des Hundes über in o-Bromhippursäure vom Sp. 153°.

0,185 g gaben 0,0572 H_2O, 0,2640 CO_2.

Gefunden:	Berechnet für: $C_9H_8Br.NO_3$ (+ H_2O)
C = 38,92 Proz.	C = 39,12 Proz.
H = 4,02 „	H = 3,62 „
N = 4,44 „	N = 5,07 „

Bei der Spaltung mit Salzsäure erhielt ich o-Brombenzoesäure, Sp. 148°.

Diese Säure hat Zincke†) durch Behandeln des o-Bromtoluols mit verdünnter NO_3H erhalten; Rhalis††) stellte fest, dafs Chromsäure zu stark oxydierend auf o-Bromtoluol wirkt und dafs auch unter dem Einflufs von Kaliumpermanganat eine teilweise Oxydation zu Oxalsäure und Kohlensäure erfolgt. Graebe†††) endlich empfiehlt ihre Darstellung aus der Anthranilsäure.

Metabromtoluol ist käuflich nicht rein zu haben; ein mir von der Firma Th. Schuchardt in Görlitz als chemisch rein geliefertes m-Bromtoluol — hergestellt aus angeblich chemisch reinem Metatoluidin — erwies sich als stickstoffhaltig*†), war auffallend

*) Annalen d. Chemie 117, 157.
**) loc. cit.
***) Annalen d. Chemie 276, 56.
†) Berl. Ber. 7, 1502.
††) Annalen d. Chemie 198, 100.
†††) loc. cit.
*†) Die Firma Th. Schuchardt hatte sich erboten, mir das seiner Zeit von Klaus aus m-Bromtoluol mittels Propylbromid und Na gewonnene

stark giftig (vergl. unten) und lieferte nach Darreichung an Hund und Kaninchen keine m-Brombenzoesäure bezw. m-Bromhippursäure.

Ich habe mir daher m-Brombenzoesäure (Sp. 155°) durch Einwirkung von Brom auf Benzoesäure im Einschlufsrohr dargestellt und diese Säure verfüttert. Im Harn des Hundes erscheint hiernach m-Bromhippursäure (Sp. 183°).

0,192 g : 0,059 H_2O, 0,2792 CO_2

Gefunden:	Berechnet für: $C_9H_8Br.NO_3$ (+ H_2O)
C = 39,65 Proz.	C = 39,12 Proz.
H = 3,41 „	H = 3,62 „
N = 4,52 „	N = 5,07 „

Bei der Spaltung mit Salzsäure entsteht wiederum m-Brombenzoesäure.

Von J. Maier*) wurde Bromhippursäure erhalten, wenn er eine siedende alkoholische Lösung von Hippursäure mit Brom versetzte, das Gemenge einige Minuten kochte, dann Wasser zufügte und auf das halbe Volumen eindampfte. Beim Erkalten schieden sich feine weifse Krystallnadeln ab. Ich habe nach diesem Verfahren unveränderte Hippursäure (Sp. 187°) wieder erhalten.

B. Versuche am Kaninchen.

Das Kaninchen scheidet nach Eingabe der chlorsubstituierten Toluole lediglich die entsprechenden Benzoesäuren aus, ohne sie mit Glykokoll zu paaren. Anders verhalten sich die bromsubstituierten Toluole; hier tritt eine Paarung mit Glykokoll ein, jedoch mit dem Unterschiede, dafs o-Bromtoluol vollständig als o-Bromhippursäure ausgeschieden wird, die m- und p-Bromtoluole bezw. Benzoesäuren nur teilweise die Paarung eingehen. Es gelingt hier, wie schon Preufse**) bei der p-Brombenzoesäure bezw. p-Bromhippursäure zeigte, mittels Petroläthers die stickstofffreien Säuren von den gepaarten zu trennen.

Beim Kaninchen erweisen sich die p-Halogentoluole als die giftigsten; am wenigsten giftig sind die Orthoverbindungen; in der Mitte steht das m-Chlortoluol. Ein mir von Th. Schuchardt geliefertes m-Bromtoluol war stärker giftig als die p-Verbindung, doch kann ich auf diese Abweichung mit

m-Cymol zu liefern; das mir gesandte vermeintliche m-Cymol war stark halogenhaltig, ebenso eine von mir nach dessen Darreichung im Harn gefundene krystallinische Säure. Dieser Umstand spricht gleichfalls gegen die Reinheit des m-Bromtoluols-Schuchardt.

*) Zeitschr. f. Chemie u. Pharm. 1865, S. 415.

**) loc. cit.

Rücksicht auf das oben Mitgeteilte keinen Wert legen. Nun hat sich bezüglich der bromsubstituierten Toluole herausgestellt, dafs die Orthoverbindung am leichtesten die Paarung mit Glykokoll eingeht, und man könnte meinen, dafs damit im Zusammenhange — die p-Chlorhippursäure ist um ein vielfaches weniger giftig als die p-Chlorbenzoesäure — ihre geringere Giftigkeit stände. Da aber die chlorsubstituierten Toluole, ohne eine Paarung beim Kaninchen einzugehen, die analogen Unterschiede in toxischer Hinsicht zeigen, so mufs prinzipiell jener Zusammenhang geleugnet werden. Das eingangs erwähnte Verhalten der Orthoverbindungen gegenüber Chromsäure legt es nahe, anzunehmen, dafs die Orthoverbindungen darum weniger giftig seien, weil sie leichter auch im Organismus oxydiert werden. Ich untersuchte daher die im Handel zugängliche o-Chlorbenzoesäure hinsichtlich ihres Schicksals im Tierkörper und fand, dafs sie nach Eingabe beim Kaninchen fast quantitativ aus dem Harn als solche wiedergewonnen werden kann. Sie ist also im Organismus weiteren Oxydationen unzugänglich. Auf anderem Wege hat schon Preufse*) beim p-Bromtoluol festgestellt, dafs das Molekül im Organismus im wesentlichen intakt bleibt, indem er kein Bromid im Harn der Tiere nachweisen konnte. Es ist hiernach nicht anzunehmen, dafs die Orthobromtoluole darum weniger giftig sind, weil sie leichter im Organismus — über die Karbonsäuren hinaus — oxydiert werden als die anderen Körper. Vielmehr haben sich bei den Oxydationsprodukten, den halogensubstituierten Benzoesäuren die analogen Unterschiede hinsichtlich ihrer Toxizität herausgestellt wie bei den Toluolen.

In beliebigen Mengen sind im Handel zu haben die o-Chlorbenzoesäure und die p-Brombenzoesäure. Die p-Brombenzoesäure erwies sich als erheblich giftiger wie die o-Chlorbenzoesäure bei Anwendung molekularer Mengen; auch letztere ist noch giftiger als Benzoesäure. 3,0 g p-Brombenzoesäure, in neutraler Lösung einem Kaninchen innerlich gegeben, führten in wenigen Stunden den Tod unter allgemeinen Lähmungserscheinungen herbei.

Zu weiteren vergleichenden Versuchen, die ich an weifsen Mäusen mit subkutaner Injektion anstellte, dienten die neutralen Lösungen der aus dem Harne der Kaninchen gewonnenen Säuren. Bei Verwendung 1proz. Lösungen der chlorsubstituierten Benzoesäuren ergab sich, dafs im Falle von p-Chlorbenzoesäure bereits

*) loc. cit.

0,35 ccm tödlich waren, von m-Chlorbenzoesäure 0,7, von o-Chlorbenzoesäure noch nicht 1,0. Äquimolekulare Lösungen der Bromderivate zeigten ein analoges Verhalten: von p-Brombenzoesäure waren 0,3 ccm bereits tödlich, von m-Brombenzoesäure 0,4, von o-Brombenzoesäure 0,5.

Die Bromderivate erweisen sich demnach als die giftigeren; doch ist das relative Verhältnis der Giftigkeit innerhalb derselben Reihe das analoge. Es ergab sich folgende Reihe, wenn die für p-Brombenzoesäure ermittelte Dosis als Einheit der Normallösung gesetzt wurde:

p-Brombenzoesäure: 1,0,	p-Chlorbenzoesäure: 1,2,
m-Brombenzoesäure: 1,3,	o-Brombenzoesäure: 1,5,
m-Chlorbenzoesäure: 2,3,	o-Chlorbenzoesäure: 3,3.

Es zeigen also die Oxydationsprodukte der halogensubstituierten Toluole in toxischer Hinsicht ein den Toluolen selbst entsprechendes Verhalten. Diese Unterschiede haben in dem einen wie im anderen Falle ihren letzten Grund in der abweichenden chemischen Struktur dieser Körper.

Das Verhalten der Amidobenzoesäuren und Toluidine im Tierkörper.

Die drei isomeren Amidobenzoesäuren zeigen ein von den halogensubstituierten Benzoesäuren abweichendes Verhalten. Die Wirkung auf das Nervensystem tritt erst bei Anwendung erheblich gröfserer Dosen auf. Subkutane Injektion von 0,05 g bei weifsen Mäusen (als Na-Salz) war im Falle der m- und p-Verbindung noch ohne Wirkung, gröfsere Dosen führten nach vorübergehender Erregung zu Lähmung. Die Orthoverbindung bewirkte schon zu 0,05 g heftige anhaltende Krampferscheinungen, denen schliefslich allgemeine Lähmung folgte. Auch beim Kaninchen erwies sich die Orthoverbindung bei innerlicher Darreichung des Na-Salzes als die giftigste.

Um die Natur der im Harne nach Einführung der Amidobenzoesäuren auftretenden Stoffwechselprodukte festzustellen, bin ich wie bei den halogensubstituierten Toluolen verfahren. Der beim Abdestillieren des Äthers zurückbleibende braun gefärbte Rückstand wurde in alkoholischer Lösung mit Tierkohle behandelt und schied auf Zusatz von Wasser eine feste, körnchenartige Substanz aus. Diese löste sich fast ganz in salzsäurehaltigem Wasser, und zwar bei allen drei Säuren in gleicher Weise. Nur dieser Teil

wurde weiter verarbeitet und dabei die unveränderte Amidobenzoesäure zurückerhalten.

Die nach Darreichung der m-Amidobenzoesäure erhaltene Säure aus Harn lieferte folgende Werte:

0,2065 g Substanz : 0,4643 CO_2, 0,1142 H_2O,
0,094 g Substanz : 6,4 ccm Zehntelsäure.
Gefunden C 61,32 Proz., H 6,14 Proz., N 9,53 Proz.
Berechnet für $C_7H_7NO_2$: C 61,31 Proz., H 5,04 Proz., N 10,22 Proz.

Die nach Darreichung der o- und p-Verbindung erhaltenen Säuren ergaben ähnliche Werte.

Die in salzsäurehaltigem Wasser nicht löslichen Anteile waren zu geringfügig, als dafs eine Verarbeitung auf Uramidobenzoesäure sich gelohnt hätte. Eine solche hat E. Salkowski*) bei der Verarbeitung des nach Eingabe von m-Amidobenzoesäure gelassenen Harnes gewonnen, wenn auch nur in sehr kleinen Mengen, wobei nicht regelmäfsig auch Amidohippursäure auftrat.

Mit Rücksicht auf das bezüglich der halogensubstituierten Toluole Ermittelte war es von Interesse, zu untersuchen, ob auch die Toluidine $C_6H_4\langle^{CH_3}_{NH_2}$ durch Oxydation von CH_3 zu COOH im Organismus in die entsprechenden Amidobenzoesäuren übergehen. Baumann und Herter**) haben festgestellt, dafs p-Toluidin keine Vermehrung der Ätherschwefelsäuren des Harnes bewirkt. Graebe und Schultzen***) haben nach Toluidineingabe die Bildung von Amidobenzoesäure und Amidohippursäure nicht mit Sicherheit nachweisen können. Auch mir gelang es bei keinem der drei Toluidine, aus dem Ätherrückstande die entsprechende Amidobenzoesäure zu isolieren. In ihrer Allgemeinwirkung zeigen die Toluidine ein den Amidobenzoesäuren entsprechendes Verhalten, indem auch hier die o-Verbindung sich als die giftigste erweist.

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 7, 93 ff.
**) Daselbst 1, 266.
***) Du Bois-Reymonds Arch. 1867, S. 169.

XVIII.

Über das Vorkommen von Albumosen im Blute.

Von Dr. med. et phil. **Leo Langstein.**

(Aus der medizinischen Klinik in Basel. Vorsteher: Prof. F. Müller.)

Die in Bd. III, Heft 1 bis 3 dieser Zeitschrift eben erschienene Arbeit von G. Embden und F. Knoop: „Über das Verhalten der Albumosen in der Darmwand und über das Vorkommen von Albumosen im Blute“ veranlaſst mich, schon jetzt Erfahrungen mitzuteilen, die ich bezüglich des Vorkommens durch Hitze nicht koagulabler Eiweiſskörper im Blute von Tier und Mensch gemacht habe. Zur Ausführung der im folgenden mitgeteilten Untersuchung hat mich eine Arbeit Zanettis*) veranlaſst, in der er über den Befund eines dem Ovomukoid ähnlichen Körpers im Ochsenblut berichtet. Zu seiner Auffindung kam Zanetti auf folgende Weise.

Verdünntes Ochsenblutserum wurde bei schwach saurer Reaktion durch Kochen enteiweiſst. Das Filtrat wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und nach starker Konzentration mit der mehrfachen Menge Alkohol behandelt. Dabei fiel ein schwach gelblich gefärbter Eiweiſskörper aus, der durch wiederholtes Lösen in Wasser und Fällen durch Alkohol gereinigt wurde. Die elementare Zusammensetzung dieses Körpers war C 47,6, H 7,1, N 12,93, S 2,38. Er gab sämtliche Eiweiſsreaktionen, enthielt reichlich bleischwärzenden Schwefel, durch Spaltung mit verdünnter Säure erhielt Zanetti ein Kohlehydrat, das er durch das Osazon charakterisierte. Die Ähnlichkeit der physikalischen und chemischen Eigenschaften dieses Eiweiſskörpers mit denen des Ovomukoids

*) Zanetti, Sull' Ovimucoide e sopra un nuovo Glicoproteide contenuto nel siero di sangue. Annali di Chimica e di Farmacologia 26, 12.



veranlafste den italienischen Forscher, ihn in die Klasse der Mukoide einzureihen.

Auch Eichholz*) spricht von einem Mukoidstoff des Blutes. Er stellt ihn aus verdünntem Pferdeblutserum durch Ausfällung mit schwacher Essigsäure dar. Eichholz sieht diesen Eiweifskörper als die Muttersubstanz der von Mörner, ihm und anderen Forschern aus Blutglobulin abspaltbaren Kohlehydrate an.

In jüngster Zeit hat auch Mörner**) zur Frage des Vorkommens eines Mukoidstoffes im Blute Stellung genommen. Er hält die Existenz eines solchen auf Grund der Untersuchung Zanettis nicht für erwiesen. Er diskutiert die Möglichkeit, dafs durch das Kochen des Blutserums zum Zwecke der Koagulation eine Spaltung des Blutglobulins stattfindet, und dafs der von Zanetti nachgewiesene Mukoidstoff ein aus dem Blutglobulin erst sekundär entstandener Eiweifskörper sei. Mörner verweist auf eigene Versuche, in denen es ihm gelang, durch blofses Kochen von Blutglobulin mit Wasser sogenanntes tierisches Gummi darzustellen.

Bei der grofsen biologischen Wichtigkeit, die den Eiweifskörpern des Blutes zukommt, erschien es mir angezeigt, durch eine gröfsere Untersuchungsreihe zur Klärung dieser strittigen Frage beizutragen. Zur Untersuchung gelangten drei Ochsenblutsera, sieben Pferdeblutsera und zweimal Blutserum vom Menschen, das durch zu kurativen Zwecken ausgeführte Aderlässe an Herzkranken mit schweren Stauungserscheinungen gewonnen war.

Meine Methodik war folgende. Mit der vierfachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünntes Serum wurde bei schwach essigsaurer Reaktion schnell aufgekocht. Das Filtrat von den durch Kochen koagulierten Eiweifskörpern wurde bei vermindertem Druck bis zu einem leicht gelblich gefärbten Sirup eingedampft und dieser mit der mehrfachen Menge Alkohols digeriert. Dabei fiel bei sämtlichen untersuchten Blutproben ein Eiweifskörper in weifsen Flocken aus, der durch zwei- bis dreimaliges Lösen in wenig Wasser und Fällen durch Alkohol schneeweifs erhalten werden konnte. Er gab sämtliche Eiweifsreaktionen; sehr beträchtliche Schwankungen zeigte die Menge, in der dieser Körper aus den einzelnen Blutproben erhalten wurde. Durch Kochen mit verdünnter Säure gelang es einige Male, Kohlehydrat abzuspalten,

*) Eichholz, Journal of physiol. 23, 176.

**) K. A. H. Mörner, Zur Kenntnis der Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 207.



ebenso oft wurde solches vermifst. Es mufs unentschieden bleiben, ob das nachgewiesene Kohlehydrat wirklich aus dem Eiweifskörper stammt, ob es nicht vielleicht in diesem beigemengten „tierischen Gummi“ seine Muttersubstanz hat; hat doch Freund*) gezeigt, dafs dieses normalerweise im Blute vorkommt. Durch Halbsättigung mit Ammonsulfat konnte dieser Körper aus seiner Lösung nicht vollständig gefällt werden; die obere Fällungsgrenze lag unterhalb der $^2/_3$-Sättigung mit Ammonsulfat.

Bei einem der untersuchten Pferdeblutsera erhielt ich kaum Spuren dieses Körpers; auffallend war mir ferner die Verschiedenheit in der Intensität der Bleischwärzung, die die von den einzelnen Blutproben stammenden Eiweifskörper bei der Prüfung auf leicht abspaltbaren Schwefel zeigten.

Bei dieser Sachlage war ich sehr geneigt, mit Mörner diesen nicht koagulabeln Eiweifskörper als ein sekundär entstandenes Produkt anzusehen. Erst die im folgenden mitgeteilten Versuche haben mich davon überzeugt, dafs ein oder mehrere nicht koagulable Eiweifskörper, die wir nach dem heutigen Stande unseres Wissens wohl als Albumosen bezeichnen müssen, in dem jeweilig untersuchten Blute zur Zeit der Untersuchung präformiert waren.

Vor allem galt es festzustellen, ob durch die Operation des Aufkochens aus Serumglobulin oder Serumalbumin ein Eiweifskörper mit den Eigenschaften des vorliegenden abgespalten wird. Die bezüglichen Versuche mit Serumglobulin und krystallisiertem Serumalbumin fielen negativ aus. Erst durch ein mindestens halbstündiges Kochen mit schwach angesäuertem Wasser läfst sich aus koaguliertem Blutglobulin in ganz geringer Menge ein Körper abspalten, der Beziehungen zu dem von Mörner beschriebenen tierischen Gummi hat. Das Serumalbumin erweist sich als noch viel resistenter. Erst nach einstündigem Kochen lassen sich in der Flüssigkeit Albumosen in spärlicher Menge nachweisen. Auf die Entstehung von albumosenähnlichen Substanzen beim Kochen nativer Eiweifskörper mit Wasser hat übrigens Neumeister**) schon vor längerer Zeit hingewiesen. Um den Einwand völlig zu entkräften, dafs der oder die nichtkoagulablen Eiweifskörper des Blutes möglicherweise doch durch die Operation des Kochens aus dem Blutglobulin abgespalten werden, habe ich noch folgenden Versuch angestellt.

*) E. Freund, Centralbl. f. Physiol. 1892, S. 345.

**) Neumeister, Lehrb. d. physiol. Chem. 1897.

Pferdeblutserum wurde mit der zehnfachen Menge absoluten Alkohols versetzt. Die ausgefällten Eiweifskörper wurden drei bis vier Wochen lang bei gewöhnlicher Temperatur in Berührung mit dem Alkohol belassen. Nach dieser Zeit wurden sie filtriert, mehrmals mit Alkohol gewaschen und scharf abgeprefst. Der Prefskuchen wurde tagelang mit Wasser unter häufigem Schütteln digeriert. Dabei ging ziemlich viel Eiweifs in Lösung. Doch enthielt diese keine Spur von Blutglobulin, das durch den Alkohol vollständig koaguliert war, hingegen gröfsere Mengen Serumalbumins. Dieses wurde durch Hitzekoagulation nach Zusatz von primärem Kaliumphosphat*) ausgefällt; die filtrierte Lösung gab, zum Sirup eingeengt, sämtliche Eiweifsreaktionen; durch Digestion mit Alkohol konnte der in Lösung befindliche Eiweifskörper ausgefällt werden. Damit dürfte der Beweis erbracht sein, dafs im untersuchten Blute ein oder mehrere nicht koagulable Eiweifskörper präformiert waren. Es erheben sich nun die wichtigen Fragen nach der Natur derselben, ihrer Stellung im System der Proteine, ihrer Genese. Zanetti spricht von einem Glykoproteid, Eichholz von einem Mukoidstoff. Meines Erachtens mufs vor allem die Frage, ob hier ein einheitliches Produkt vorliegt, unentschieden bleiben. Die Elementaranalyse allein kann uns darüber keinen Aufschlufs geben. Mir scheinen die wechselnden Mengenverhältnisse dieses Körpers in verschiedenen Blutarten sogar direkt gegen die Annahme seiner Einheitlichkeit verwertet werden zu können, ebenso wie der verschieden starke Ausfall der Reaktion auf leicht abspaltbaren Schwefel. Ob wir den Körper seiner Konstitution nach in die Gruppe der Glykoproteide einbeziehen dürfen, mufs mit Rücksicht auf die Möglichkeit einer Verunreinigung mit tierischem Gummi dahingestellt bleiben. Mit dem Begriff eines Mukoids zu operieren, halte ich bei dem gegenwärtigen Stand der Eiweifschemie für ein mifslich Ding. Die Eigenschaften eines solchen sind viel zu wenig scharf umschrieben, als dafs man unseren Eiweifskörper schlechtweg zu den Mukoiden zählen dürfte. Es präjudiziert wohl am wenigsten, wenn wir den besprochenen Eiweifskörper als Albumose resp. als ein Gemenge von Albumosen ansehen.

Sehr wichtig ist nun die Beantwortung der Fragen nach der Bildungsstätte dieser Albumosen, nach ihrer Bedeutung für den Stoffwechsel. Vor allem wäre zu entscheiden, ob die Albumosen

*) Vgl. J. Schütz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 5.

als solche im normalen Blute kreisen, ob sie sich nicht, woran natürlich gedacht werden mufs, erst nach der Entnahme aus dem Organismus durch die im Blute vorhandenen Fermente aus seinen Eiweifskörpern gebildet haben. Letzteres erscheint mir allerdings mit Rücksicht darauf, dafs das Blut sofort nach der Entnahme aus der Vene verarbeitet werde, unwahrscheinlich, ist jedoch noch zu diskutieren.

Sind die Albumosen jedoch, was ich auf Grund meiner Untersuchungen fast für gesichert halte, auch im kreisenden Blute vorhanden, dann wird das Studium der Bedingungen ihres Auftretens, ihrer Mengenverhältnisse äufserst wichtig werden. Dieses wird auch der Pathologie mit Rücksicht auf das Phänomen der Albumosurie zu gute kommen.

XIX.

Untersuchungen über die Blutgerinnung bei wirbellosen Tieren.

Vorläufige Mitteilung.

Von Dr. V. **Ducceschi**, Rom.

[Aus der zoologischen Station zu Neapel (Abteilung für Physiologie).]

Das Blut zahlreicher wirbelloser Tiere erleidet, wenn es den Gefäfsen oder den Lakunen entnommen wird, Veränderungen seines makroskopischen Aussehens, welche bei weitem nicht jene Gleichförmigkeit aufweisen, die uns bei der Blutgerinnung der Wirbeltiere entgegentritt. Bei einigen Arten (ich habe hier stets wirbellose Seetiere im Auge), z. B. bei einigen Krustaceen (Palinurus, Homarus und anderen), erstarrt das Blut binnen einer Minute nach Entnahme in seiner Gesamtheit zu einer kompakten, gelatinösen Masse, welche nach einiger Zeit ein paar Tropfen einer noch gerinnungsfähigen Flüssigkeit austreten läfst. Diese schon seit langer Zeit bekannte Form der Gerinnung hat in ihrem äufseren Verhalten am meisten Ähnlichkeit mit der Blutgerinnung der Wirbeltiere. Hingegen hat das Blut anderer wirbelloser Seetiere nach Entnahme aus dem Organismus in seinem Verhalten viel weniger Ähnlichkeit mit einem wahren und eigentlichen Gerinnungsprozesse. Bei einigen Echinodermen (z. B. beim Strongylocentrotus lividus) wird die periviscerale Flüssigkeit fast augenblicklich trübe, sobald sie der Körperhöhle, in welcher sie eingeschlossen ist, entnommen wird, nach 1 bis 2 Minuten beginnt sich von der äufsersten Peripherie eine wolkige Trübung loszulösen, welche deutlich die Form eines Netzes mit mehr oder weniger regelmäfsigen Maschen annimmt, sich langsam zusammenzieht und sich schliefslich meist in eine einzige kompakte, auf dem Boden des Gefäfses liegende

Flocke verwandelt. Bei einigen Würmern hingegen (z. B. bei Sipunculus nudus) wird zwar das Blut gleich nach seiner Entnahme ebenfalls trübe, aber statt eines zusammenhängenden Gerinnsels bildet sich binnen weniger Zehntelsekunden ein äufserst feiner Niederschlag, der sich schnell zu Flocken vereinigt und auf dem Boden des Gefäfses absetzt. Bei Phymosoma granulatum habe ich beobachtet, dafs das Gerinnsel ein Aussehen annimmt, das dem bei Krustaceen beobachteten oben beschriebenen ähnelt. Das Blut erstarrt binnen 40 bis 50 Sekunden zu einer kompakten, transparenten Masse, in deren Innerem man deutlich die ziemlich grofsen Maschen eines ausgedehnten Netzes wahrnimmt. Taucht man aber ein Glasstäbchen in das Gerinnsel, so scheidet letzteres plötzlich eine grofse Menge klarer Flüssigkeit aus, die nicht mehr imstande ist, zu koagulieren. Sie war in den Maschen des Netzes enthalten, das sich alsdann schnell zu einigen oder mehreren Flocken zusammenzieht. Von gelatinöser Substanz zeigt sich keine Spur.

Das mikroskopische Bild dieser Gerinnungsformen ist schon wiederholt und eingehend beschrieben worden (Geddes, 1880; Halliburton, 1885; Löwit, 1889; Cattaneo, 1889 bis 1891; Hardy, 1892). Die beobachteten Veränderungen bestehen hauptsächlich darin, dafs einzelne morphologische Elemente des Blutes zahlreiche amöboide Fortsätze aussenden, welche miteinander verschmelzen; dasselbe thun zuweilen auch die Zellkörper, indem sie Plasmodien oder mehr oder weniger regelmäfsige Netze oder Fibrillenbündel bilden, welche das Aussehen des Fibrins annehmen. Halliburton hat bei den Krustaceen nachgewiesen, dafs der Gerinnungsprozefs der Einwirkung eines Ferments auf eine dem Fibrinogen analoge Eiweifssubstanz zuzuschreiben ist, welche sich im Augenblicke der Gerinnung im Blute dieser Tiere befindet.

Die Untersuchung des Gerinnungsvorgangs bei Wirbellosen wird in hohem Mafse durch die Verwendung von Kokain erleichtert welches, wie weiter unten erörtert wird, ermöglicht, den Vorgang in jeder beliebigen Phase zu fixieren. Von meinen mikroskopischen Beobachtungen sei als notwendig hierher gehörig nur die folgende angeführt. Bei einigen Krustaceen (z. B. bei Palinurus vulg.) erhält man, wenn man das Blut ruhig gerinnen läfst, eine kompakte, gleichförmige, transparente Masse von der Konsistenz einer ziemlich dicken Gallert, die sich unter dem Mikroskop auch nach Tinktion als eine amorphe, glasartige Substanz darstellt, welche nur spärliche mit Gentianaviolett leicht färbbare Fasern aufweist. Auf dem Boden des Glases bemerkt man hingegen eine weifs-

liche, opake Schicht, die sich unter dem Mikroskop als ein dichtes Geflecht feiner Fasern von ungleicher Stärke erweist, die sich mit Gentianaviolett färben lassen und sich hier und da zu einem ganz regelmäfsigen Netze anordnen, in dessen Maschen man zahlreiche mehr oder weniger veränderte morphologische Elemente sieht.

1. Einwirkung der Salze.

Meine Untersuchungen beziehen sich von Echinodermen auf Strongylocentrotus lividus, von Würmern auf Phymosoma granulatum und Sipunculus nudus, von Krustaceen auf Carcinus maenas, Palinurus vulg., Maja squinado sowie Maja verrucosa.

Gesättigte Lösungen von Magnesiumsulfat, Natriumsulfat, Kochsalz und Natriumphosphat (Na_2HPO_4) verhindern bei den von mir untersuchten Spezies die gewöhnlichen Veränderungen des Blutes nach seiner Entnahme, wenn das Volum des Zusatzes 4 bis 5 mal so grofs ist wie dasjenige des Blutes. Einige davon bedingen das Erscheinen von Eiweifsniederschlägen. Dies war hinsichtlich des Palinurus (Halliburton) und einiger anderer Spezies bereits bekannt.

Die Verdünnung des Blutes mit mehreren Volumina von aq. dest. oder Seewasser verzögert zwar, verhindert aber nicht die Bildung der Plasmodien oder der fibrinähnlichen Netze oder Bündel. Bei Palinurus zeigt sich das gelatinöse Gerinnsel nicht, wenn man dem Blute das 2,5- bis 3fache seines Volumens an Wasser hinzusetzt, das wie Fibrin aussehende Gerinnsel dagegen tritt in gleicher Weise auf.

Läfst man das Blut in eine Lösung von Kaliumoxalat fliefsen, die vermöge ihrer Konzentration hinreicht, das im Blut enthaltene Calcium zu sättigen, so gerinnt das Blut trotzdem; nur die gesättigte Lösung von oxalsaurem Kali verhindert die Blutgerinnung (Bottazzi, 1902, bei Palinurus und Maja squinado). Dieselbe Thatsache habe ich auch bei Strongylocentrotus liv., Sipunculus, Phymosoma, Carcinus maenas und Maja verrucosa konstatiert; ja bei diesen Spezies scheint die Zufügung eines Volums $2^1/_2$ proz. Oxalatlösung die Bildung des Gerinnsels zu begünstigen. Auch der Zusatz von Natriumoxalat bis zur Sättigung, von Natriumcitrat bis zu 5 Proz., von Fluornatrium bis zu 3 Proz. bildet kein Hindernis für die Bildung der Plasmodien und des fibrinähnlichen Gerinnsels.

Die gesättigte Lösung von Kaliumoxalat verhindert, zu gleichen Volumteilen zugefügt, das Auftreten der charakteristischen Blutveränderungen. Verdünnt man aber die Mischung mit Wasser, so erscheint das Gerinnsel sofort; dies beweist, daſs nicht die Fällung des Calciums, sondern die Konzentration der Salzlösung das Hindernis für die Bildung des Gerinnsels darstellt.

Dasselbe gilt hinsichtlich des fibrinähnlichen Gerinnsels bei Palinurus. Fügt man jedoch dem Blute (bei meinen Experimenten lieſs ich das Blut immer direkt in die Lösungen der Salze flieſsen) auch nur die Hälfte seines Volumens in Gestalt einer 2 proz. Lösung von oxalsaurem Kali oder citronensaurem Natrium bezw. Fluornatrium hinzu, so bildet sich gar kein gelatinöses Gerinnsel; man erhält dieses jedoch sofort, wenn man nach Einwirkung jener Salze der Mischung einige Tropfen einer konzentrierten Lösung von Calciumchlorid hinzusetzt.

Injektion von konzentrierten 2 proz. Lösungen von oxalsaurem Kali, oxalsaurem oder citronensaurem Natrium in das Innere des Körpers verhinderte nicht die Blutgerinnung unter Bildung von Plasmodien oder Fibrin; bisweilen ruft sie sogar (wie z. B. beim Strongylocentrotus) die Bildung des Gerinnsels im Innern des Organismus hervor.

Diese Thatsachen legen die Annahme nahe, daſs dem Calcium bei den Gerinnungserscheinungen, welche das Blut der Wirbellosen darbietet, nicht die Rolle zukommt, die es bei der Blutgerinnung der Wirbeltiere spielt. Dies ist um so bemerkenswerter, als sich, wenigstens was die Krustaceen betrifft, das Gerinnsel durch die Einwirkung eines Enzyms auf eine Substanz bildet, welche die Eigenschaften des Fibrinogens besitzt und beim Gerinnen zum Teil das mikroskopische Aussehen des Fibrins annimmt.

Nur die Bildung der amorphen gelatinösen Substanz, welche man bei Palinurus beobachtet, und wahrscheinlich auch die ähnlicher Produkte, die man bei anderen Krustaceen erhält (Squilla mantis u. s. w., mitunter auch bei Carcinus maenas), scheinen von der Anwesenheit der Calciumsalze im Blute abhängig zu sein.

2. Einwirkung des Kokains.

Vermischt man das Blut der von mir beobachteten Spezies von Seetieren mit gleichen Teilen einer 2- bis 3 proz. Lösung von salzsaurem Kokain in Seewasser, so zeigt das Blut nicht mehr bei Entnahme aus dem Tierkörper die charakteristischen Gerinnungs-

erscheinungen. Statt der Gerinnselbildung erfolgt die Abscheidung eines sehr feinen, pulverig sich absetzenden Niederschlages, der sich unter dem Mikroskop als aus isolierten morphologischen Elementen (Amöbocyten) zusammengesetzt erweist, die gröfstenteils die normale rundliche Gestalt behalten haben. Die Aussendung der Pseudopodien ist nicht erfolgt.

Auch einige Stunden nach Einwirkung des Giftes fehlt das Gerinnsel; noch nach 16 bis 24 Stunden bewahrt der gröfsere Teil der Amöbocyten seine rundliche Gestalt, ein kleinerer Teil hat sich aufgelöst, und man bemerkt das Auftreten einzelner fibrinähnlicher Fasern und Faserbündel. Bei Verwendung von weniger konzentrierten Kokainlösungen gelingt es, den Gerinnungsprozefs nur teilweise aufzuhalten und im mikroskopischen Präparate die Zwischenphasen desselben zur Darstellung zu bringen.

Die Wirkungen des Kokains sind noch augenfälliger, wenn es solchen Tieren beigebracht wird, in welchen die Verteilung des Giftes in schneller und gleichförmiger Weise vor sich geht. Dies ist der Fall bei Strongylocentrotus, bei welchem die geformte Elemente enthaltende Nährflüssigkeit, die man vielleicht nicht im strengen Sinne des Wortes Blut nennen kann, sich in der weiten perivisceralen Höhlung beisammen findet. Bei Exemplaren von Strongylocentrotus, die etwa 35 bis 45 g wiegen und etwa 10 ccm periviscerale Flüssigkeit enthalten, verhindert die Injektion von 1 ccm der 2,5 proz. Kokainlösung in die Körperhöhle die Gerinnselbildung. In diesem Falle ist das Kokain in einer Verdünnung wirksam, die viel gröfser ist, als wenn man die Mischung in vitro vornimmt, wobei allerdings Umstände, welche die Bildung des Gerinnsels begünstigen (Kontakt mit Fremdkörpern u. s. w.) ihren Einflufs geltend machen.

Wenn man 10 Minuten nach Ausführung der Kokaininjektion das Blut entnimmt, so bildet sich statt des Gerinnsels ein pulveriger Niederschlag; derselbe besteht aus den isolierten Amöbocyten, welche ihre normale rundliche Gestalt beibehalten.

Es ist bemerkenswert, dafs die Kokaindosis, welche ausreicht, um die Gerinnung zu verhindern, nicht imstande ist, alle morphologischen Elemente des Blutes zu töten. Die Körperhöhlenflüssigkeit von Strongylocentrotus enthält verschiedene Formen von Amöbocyten. Einige sind farblos und fein granuliert, während andere grobe, stark Licht brechende Granulationen enthalten (maulbeerförmige Körper). Sodann finden sich Amöbocyten, welche grofse rötliche oder gelb-grünliche Körner einschliefsen, endlich

findet man eine mäfsige Anzahl ziemlich kleiner, beweglicher Zellen, die mit einer Art schweifförmigem Fortsatz versehen sind, welcher ihnen eine schnelle Rotationsbewegung ermöglicht (Cuénot, 1891). Nun habe ich bei den Versuchen, die ich angestellt habe, sei es, indem ich das Blut direkt in die Kokainlösung fliefsen liefs, oder indem ich dem Tiere das Gift injizierte, immer eine grofse Zahl dieser Elemente im Zustande der Thätigkeit gefunden, und erst nach Stunden wurden die Bewegungen allmählich schwächer und schwanden dann völlig. Wenn ich das Blut in eine 5 proz. Lösung von salzsaurem Kokain hatte fliefsen lassen, fanden sich noch nach einer Stunde bewegliche Elemente. Dies stimmt sehr gut zu der Thatsache, die sich aus der mikroskopischen Untersuchung des gerinnenden Blutes ergiebt, dafs es hauptsächlich die Amöbocyten mit farblosen Körnern sind, welche das Gerinnsel bilden.

Läfst man das Blut in Lösungen von verschiedenem Gehalt an Atropin, Menthol, Digitalin oder Akonitin einfliefsen, so sieht man keine Abweichung von dem gewöhnlichen Verhalten. Auch nach Hinzufügung eines gleichen Volums mit Chloroform gesättigten Seewassers erfolgt schnelle Gerinnselbildung. Die Injektion der Lösungen dieser Gifte (bis zur Konzentration von 2 Proz.) in die periviscerale Höhlung desselben Tieres verhindert das Auftreten des Gerinnsels durchaus nicht, ja letzteres bildet sich zuweilen sogar in der Höhlung des Körpers. Nur bei Applikation des Atropins in derselben Art und Dosis wie beim Kokain erhält man ein unvollständiges Gerinnsel, das sich langsam zusammenzieht.

Die Injektion von mit Chloroform gesättigtem Seewasser in das Innere von Strongylocentrotus erzeugt gewöhnlich die Gerinnung des Blutes in situ; taucht man jedoch das Tier in das Chloroform enthaltende Seewasser und läfst es ein paar Stunden darin, so gerinnt das nachher entnommene Blut nicht mehr, sondern hinterläfst auf dem Boden des Recipienten einen pulverartigen Niederschlag, der aus rundlichen isolierten Amöbocyten besteht, die keine Fortsätze zeigen und vollkommen denjenigen ähnlich sind, welche man nach der Einwirkung des Kokains beobachtet.

Was das Blut von Palinurus betrifft, so verhindert das Kokain, wenn es in denselben Verhältnissen wie bei Strongylocentrotus verwendet wird, die Bildung des fibrinähnlichen Gerinnsels und läfst den gröfsten Teil der Amöbocyten unverändert. Doch bildet sich das gelatinöse Gerinnsel, wenn auch erst einige Stunden nach dem Giftzusatz, wahrscheinlich wenn sich ein gewisser Teil der Amöbocyten aufgelöst oder anderweitig verändert hat.

Wie läfst sich nun diese Wirkung des Kokains erklären?

Das Kokain lähmt die amöboiden Bewegungen der geformten Elemente des Blutes; diese Thatsache ist bereits an den Lymphzellen (Aducco, 1889) und an den Amöbocyten des Krebses beobachtet worden (Albertoni, 1890). Nun besteht die erste Leistung der Amöbocyten einige Sekunden nach Entnahme aus dem Organismus in der Aussendung zahlreicher langer Pseudopodien, die mit denjenigen anderer Amöbocyten verschmelzen. Inwiefern diese Thätigkeit zur Bildung des Gerinnsels speziell des deutlicher ausgeprägten fibrinösen (da ja das gelatinöse eine wesentlich verschiedene Erscheinung darzustellen scheint), nötig ist, und ob das Kokain nur insoweit einwirkt, als es die Aussendung der Pseudopodien verhindert, kann ich einstweilen nicht mit Bestimmtheit entscheiden.

Es könnte ja auch sein, dafs das Kokain seine Wirkung derart ausübte, dafs es die von Hardy bei den Krustaceen beschriebene Erscheinung des „explosiven Zerfalls“ der besonders an der Gerinnselbildung beteiligten Elemente (explosive corpuscles) hintanhielte. Oder es könnte sich auch die Wirkung des Kokains durch die von Löwit als Plasmoschise bezeichnete ähnliche Erscheinung erklären, welche im Austreten kleiner Partikeln aus den Amöbocyten in Gestalt von Körnern oder Tröpfchen besteht und nach Ansicht des genannten Autors in engster Beziehung zu der Bildung des Gerinnsels steht.

Mögen es nun diese oder andere Gründe sein, derentwegen das Blut nach Einwirkung des Kokains oder des Chloroforms nicht mehr gerinnt, jedenfalls deutet diese Thatsache darauf hin, dafs eine der ersten Phasen des Gerinnungsprozesses bei den wirbellosen Seetieren durch ein aktives Eingreifen, durch eine spezifische funktionelle Reaktion bestimmter morphologischer Elemente des Blutes zustande kommt; erfolgt der Tod dieser Elemente, ohne dafs eine solche Reaktion eintritt, so bilden sich das fibrinähnliche Gerinnsel und das Plasmodium nicht.

Die Untersuchungen bezüglich des Wirbeltierblutes, mit denen ich eben beschäftigt bin, werden zeigen, inwieweit das im vorhergehenden Ausgeführte auf die gegebenen Verhältnisse bei höheren Tieren übertragbar ist.

Kürzere Mitteilungen.

4. Über die quantitative Hippursäurebestimmung beim Menschen.

Von Dr. **Ferdinand Blumenthal**

und

Dr. med. **A. Braunstein** aus Charkow.

(Aus dem Laboratorium der I. medizin. Klinik zu Berlin.)

Für Harne von Pflanzenfressern, welche reichlich Hippursäure ausscheiden, haben Bunge und Schmiedeberg*) eine Methode der Hippursäurebestimmung angegeben, welche noch heute als die beste zum Nachweis der Hippursäure bezeichnet werden mufs.

Beim menschlichen Harn, der nur geringe Mengen Hippursäure enthält, versagt diese Methode aber fast immer, weil es nicht gelingt, die Hippursäure am Ende des Verfahrens wegen ihrer geringen Menge zur Krystallisation zu bringen. Man mufste also, wollte man beim Menschen den Hippursäurestoffwechsel erforschen, meist in anderer Weise verfahren.

Am nächstliegenden war es, auf die Reindarstellung der Hippursäure zu verzichten und sie aus dem Stickstoffgehalt der zum Schlufs nach Bunge-Schmiedeberg erhaltenen Lösung zu berechnen. — Bei dem Bunge-Schmiedebergschen Verfahren wird nun die Hippursäure in Essigäther ausgeschüttelt; der Essigäther nimmt aber, wie E. Salkowski zuerst festgestellt hat, Harnstoff mit auf, der sich selbst nach Waschen des Essigäthers mit Wasser nicht ganz aus demselben entfernen läfst. Es versuchte deshalb der eine von uns (Bl.) ein Verfahren anzuwenden, dessen sich E. Salkowski**) zur Hippursäurebestimmung beim Kaninchen bedient hat. Das Verfahren wurde so modifiziert, dafs der Äther-Alkoholauszug nicht durch Abdampfen auf Natronkalk, sondern durch Schütteln mit Wasser von Harnstoff befreit wurde. Der Stickstoffgehalt der restierenden Ätherlösung wurde

*) Bunge und Schmiedeberg, Arch. f. exper. Path. **16**, 235.

) E. Salkowski, Zeitschr. f. physiol. Chem. **12.

dann nach Kjeldahl bestimmt. Die Methode*), die sich schliefslich ergab, war folgende:

300 ccm Harn werden schwach mit Sodalösung alkalisiert und erst auf freiem Feuer, sodann auf dem Wasserbade zur Trockne verdampft. Der Rückstand wird 2 mal mit je 150 ccm 96 proz. Alkohol auf dem erwärmten Wasserbade ausgezogen und filtriert, die Filtrate vereinigt und auf dem Wasserbade zur Sirupdicke verdunstet. Der Sirup wird, in etwa 50 ccm Wasser gelöst, mit etwa 10 ccm 20- bis 25 proz. Salzsäure oder Schwefelsäure versetzt und im Schütteltrichter mit je 200 ccm Äther, der 20 ccm 96 proz. Alkohol enthält, kräftig unter Lüftung durchgeschüttelt. Der Ätherauszug wird einmal mit destilliertem Wasser (etwa 75 ccm) gewaschen und dann der Äther abdestilliert. Das Ausschütteln mit Äther wird im ganzen 4 mal wiederholt. Die Destillationsrückstände werden in 20 ccm destilliertem Wasser gelöst, in einen Kjeldahlkolben durch einen Trichter gegossen, wenn die Lösung wenig Farbstoff enthält, und mit Wasser nachgespült. Enthält die Lösung viel Farbstoff, so bringt man sie in den Schütteltrichter zurück und schüttelt sie vorsichtig mit 15 ccm Chloroform aus, das den Farbstoff aufnimmt. Nach Ablassen des Chloroforms bringt man die wässerige Flüssigkeit in den Kjeldahlkolben, setzt sehr vorsichtig 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzu (sehr starke Erhitzung), schüttelt dann gut durch, fügt etwas Kupfersulfat hinzu und verbrennt. Das weitere Verfahren der Stickstoffbestimmung ist das gewöhnliche. Man legt 25 ccm $^1/_{10}$-N.-Schwefelsäure vor, die verbrauchten Kubikcentimeter werden mit 17,9 multipliziert, und der erhaltene Wert ist die in 300 ccm enthaltene Hippursäure in Milligramm.

Es zeigte sich, dafs dieses Verfahren 15 Proz. weniger als die Bunge-Schmiedebergsche Methode lieferte und die Werte nur als Vergleichswerte innerhalb einer Versuchsreihe Bedeutung haben. Diese Methode ist dann unter dem Namen Salkowski-Blumenthalsche Methode von anderen Autoren angewandt worden; nur Soetbeer bezeichnet sie als Blumenthalsche Methode.

Soetbeer hat Versuche zu ihrer Prüfung vorgenommen und kommt in Bd. 35, S. 536 der Zeitschrift für physiologische Chemie zu dem Ergebnis, „dafs die Blumenthalsche Methode der Hippursäurebestimmung unbrauchbar ist“. — Dieses Urteil gründet sich darauf, dafs ein Teil des Stickstoffs, welcher angeblich nach Blumenthal als Hippursäure berechnet wird, mit Magnesia abgespalten werden kann, was bei der Hippursäure nicht geschieht, und zwar 64,4 Proz., ferner dafs salpetersaures Quecksilberoxyd, welches Hippursäure nicht fällt, 43 Proz. der nach Blumenthal als Hippursäure berechneten Substanz niederschlägt.

Bei der Durchsicht der Arbeit Soetbeers fiel uns sofort auf, dafs Soetbeer in einem sehr wesentlichen Punkt von den Angaben Blumenthals abgewichen ist, indem er nämlich, während Blumenthal vorschreibt, je 200 ccm Äther mit etwa 75 ccm Wasser zu schütteln, je 800 ccm Äther mit 75 ccm Wasser ausgeschüttelt hat. — Es handelt

*) F. Blumenthal, Zeitschr. f. klin. Mediz. 40, H. 3 u. 4.

sich nämlich bei dieser Prozedur darum, den in den Alkoholäther übergegangenen Harnstoff zu entfernen.

Vermutlich ist Soetbeer durch ein Mifsverständnis zu seiner Abweichung gelangt. Die Angaben Blumenthals lauten, wie oben angeführt, „der Ätherauszug wird einmal mit destilliertem Wasser gewaschen (etwa 75 ccm) und dann der Äther abdestilliert. Das Ausschütteln mit Äther wird im ganzen 4 mal wiederholt“. Es ist hierbei gemeint, dafs jeder Ätherauszug mit 75 ccm Wasser gewaschen wird; es hätte ja gar keinen Sinn, nur den ersten Auszug mit Wasser zu waschen und die übrigen 4, die ja ebenfalls Harnstoff enthalten, nicht.

Da weder Lewin, noch der eine von uns (Bl.), noch, wie ich höre, andere, welche diese Methode gebraucht haben, diese Stelle anders, als sie gemeint ist, aufgefafst und danach gehandelt haben, so können die Versuche Soetbeers nicht, wie er behauptet, ohne weiteres die Versuchsergebnisse der Autoren, welche mit dieser Methode gearbeitet haben, in Frage stellen.

Dafs etwa eine Verunreinigung der Ätherauszüge mit Harnstoff bei dem Verfahren von Salkowski-Blumenthal in dem von Soetbeer angegebenen Umfang erfolgt, war von vornherein unwahrscheinlich.

3 Versuche, welche so angestellt waren, dafs die Lösung von 8 bis 10 g Harnstoff 5 mal mit 200 ccm Äther (10 Volumen Alkohol enthaltend) nach Ansäuern mit Salzsäure ausgeschüttelt und jede Ätherportion mit 75 ccm Wasser gewaschen wurde, hatten nämlich gezeigt, dafs der Ätherrückstand an Stickstoff enthielt

im Versuch 1: 0,0004 g
„ „ 2: 0,0006 „
„ „ 3: 0,0003 „

d. h. Stickstoffmengen, welche innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik liegen.

Wir können also sagen, dafs der Ätherrückstand, wie er nach der Salkowski-Blumenthalschen Methode erhalten wird, harnstofffrei ist.

Da aber der von Soetbeer für zweckmäfsig erachtete Weg der Kontrolle noch nicht an der unmodifizierten Salkowski-Blumenthalschen Methode eingeschlagen war, so untersuchten wir, ob bei genauer Innehaltung der Vorschriften die Methode dieser Kontrolle standhielt.

Versuch 4. Lösung von Hippursäure + Harnstoff. (1,3006 g Hippursäure + 10 g Harnstoff in 1 Liter Wasser gelöst.)

300 ccm dieser Lösung verarbeitet nach Salkowski-Blumenthal. Der erhaltene Ätherrückstand wird mit Wasser auf 120 ccm gebracht.

Davon werden:

a) 40 ccm 3 Stunden mit 15 g Magnesia destilliert, indem dieselben auf 200 ccm mit Wasser verdünnt werden. In die vorgelegte $^1/_{10}$-Schwefelsäure ist **kein Ammoniak** übergegangen.

b) 40 ccm werden mit salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt; es entsteht kein Niederschlag.



Versuch 5. Wir haben nun Harn nach Salkowski-Blumenthal behandelt und zwar je 300 ccm. Der Ätherrückstand wurde mit 150 ccm Wasser verdünnt und mit 10 g Magnesia destilliert. Es wurden 100 ccm abdestilliert und dann noch 2 mal auf 150 aufgefüllt und wieder bis auf 50 ccm Rückstand abdestilliert. Im ganzen wurde etwa 3 Stunden destilliert. In die vorgelegten 15 ccm $^1/_{10}$-Normalsäure müssen zur Sättigung 14,4 ccm $^1/_{10}$-Normallauge eingelassen werden. Es ist also übergegangen 0,00084 g Stickstoff oder auf Harnstoff berechnet 0,0018 g. Es würden also bei der Salkowski-Blumenthalschen Methode 0,0107 g Hippursäure zu viel in 300 ccm Harn gefunden worden sein.

Versuch 6. 900 ccm Harn nach Salkowski-Blumenthal behandelt. Nach dem Abdestillieren wird der Ätherrückstand in 300 ccm Wasser gelöst.

a) 100 ccm werden mit 5 g Magnesia 3 Stunden destilliert. Es ist in der vorgelegten $^1/_{10}$-Säure kein NH_3 nachweisbar.

b) 100 ccm werden nach Kjeldahl verbrannt. Es werden 0,0522 g Stickstoff gefunden.

c) 100 ccm werden mit 25 ccm salpetersaurem Quecksilberoxyd (Lösung, wie sie zum Titrieren nach Liebig benutzt wird) versetzt. Es entsteht erst eine leichte Trübung, die sich allmählich zu einem Niederschlag verdichtet. Von dem Niederschlag wird abfiltriert; derselbe wird ausgewaschen. Das Filtrat wird auf dem Wasserbade eingeengt und der Stickstoffgehalt bestimmt. Es werden 0,0822 g Stickstoff gefunden. Es ist hier mehr Stickstoff gefunden als im Versuch b. Die Menge ist aber gröfser, als dafs sie durch den geringen Gehalt des zugesetzten Stickstoffs im salpetersauren Quecksilberoxyd bedingt sein könnte. Es liegt also ein Bestimmungsfehler vor, weshalb ein neuer Versuch nötig wurde.

Versuch 7 wie Versuch 6.

a) 100 ccm Ätherrückstand wie No. 3 mit 5 g Magnesia destilliert. Es ist kein Ammoniak übergegangen.

b) 100 ccm nach Kjeldahl behandelt. Es werden 0,1078 g Stickstoff gefunden.

c) 100 ccm werden mit 15 ccm salpetersaurem Quecksilberoxyd versetzt. Von dem allmählich sich bildenden Niederschlag wird abfiltriert u. s. w.

Stickstoffgehalt des Filtrats 0,095 g Stickstoff.

Es sind also 88,3 Proz. des gesamten Stickstoffs im Filtrat vorhanden.

Dafs der Ätherrückstand durch Quecksilberoxydnitrat fällbare Substanz enthält, dürfte wohl nicht auffallen, aber diese Substanz ist sicherlich nicht Harnstoff. Sie ist wohl nicht einmal stickstoffhaltig. Dies kann wohl behauptet werden, da bei jedem Filtrieren geringe Verluste entstehen.

Alle diese Versuche zeigen übereinstimmend, dafs der Ätherrückstand keinen Harnstoff in irgendwie in Betracht kommender Menge enthält.

Damit dürfte gezeigt sein, dafs die Vorwürfe Soetbeers sich nur auf die von ihm gemachte Abweichung von der Salkowski-Blumenthalschen Methode, nicht aber auf diese selbst beziehen.

Soetbeer erhebt nun aber noch einen zweiten Vorwurf. Er schreibt: „Blumenthal hat es unterlassen, auch nur den Versuch zu

machen, den am Schlufs seines Verfahrens aus dem Harn erhaltenen Stickstoff als wirklichen Hippursäurestickstoff zu identifizieren."

Ein solcher Versuch ist nun aber thatsächlich in der Arbeit von Bl. mitgeteilt. Da ihn Soetbeer offenbar übersehen hat, so sei derselbe hier noch einmal angeführt (Zeitschr. f. klin. Med. **40**, H. 3 u. 4. Sep.-Abdr. S. 4).

„Trotzdem es eigentlich unmöglich war, dafs der Ätherrückstand nach Behandlung mit Chloroform eine andere stickstoffhaltige Substanz enthalten konnte als Hippursäure, hielt ich es doch für wünschenswert, zu vergleichen, wie weit der Wert der Hippursäure nach der Methode durch Stickstoffbestimmung von dem Wert der Reindarstellung der Hippursäure differiert.

Ich wandte hierzu Harn von einer Patientin an, die Chinasäure (5,0 g) pro die erhalten hatte, nach welcher reichliche Hippursäureausscheidung eintritt. Ich konnte normalen Harn nicht nehmen, weil es mir wiederholt nicht gelungen war, aus normalem Harn (300 ccm) ohne sehr grofse Verluste so viel reine Hippursäure zu erhalten, dafs ich diese hätte durch Wägung bestimmen können. Der Ätherrückstand, den ich aus 300 ccm Harn nach Chinasäureverfütterung erhalten hatte, wird in Wasser gelöst und mit Chloroform im Schütteltrichter behandelt (sehr vorsichtig geschüttelt), das Chloroform abgelassen und die wässerige Flüssigkeit genau auf 100 ccm gebracht. In 20 ccm wird der Stickstoffgehalt bestimmt und auf 100 ccm und Hippursäure berechnet. Demnach waren in den 300 ccm Harn enthalten Hippursäure 0,243 g. 80 ccm werden auf dem Wasserbade langsam zur Trockne verdampft, der Rückstand wird 2 mal mit Petroläther zur Entfernung der Benzoesäure extrahiert. Der noch etwas schmierige Rückstand wird mit 25 ccm Wasser durch Erwärmen in Lösung gebracht und mit etwas Knochenkohle behandelt. Nun wird filtriert, mit heifsem Wasser nachgewaschen und vorsichtig bis auf 5 ccm eingedampft. Am nächsten Tage wird die ausgeschiedene Hippursäure auf ein gewogenes Filter gebracht, bei 80° zwei Stunden getrocknet und gewogen.

In 100 ccm waren erhalten worden, nachdem das Resultat auf 300 ccm Harn berechnet war, 0,221 g Hippursäure."

Damit dürften sich die Soetbeerschen Vorwürfe auch nach dieser Richtung als ungerechtfertigt erledigen.

Gelegentlich dieser Untersuchungen ergab sich nunmehr, wie schon früher der eine von uns (Bl.) festgestellt hat, dafs die Salkowski-Blumenthalsche Methode 15 Proz. weniger liefert als die Standardmethode von Bunge und Schmiedeberg.

Versuch 8. Urinmenge 1030 ccm.

a) 500 ccm enthalten nach Salkowski-Blumenthal 0,214 g Hippursäure.

b) 500 ccm enthalten nach Bunge-Schmiedeberg 0,233 g Hippursäure

Versuch 9. Urinmenge 680 ccm.

340 ccm Hippursäurebestimmung nach Salkowski-Blumenthal 0,263 g, nach Bunge-Schmiedeberg 0,300 g.

Dies liegt daran, dafs der Essigäther die Hippursäure besser aufnimmt als der Ätheralkohol. Auf der anderen Seite zeigten aber neuer-

dings angestellte Versuche dasselbe Ergebnis, wie es schon früher Salkowski gehabt hatte, dafs trotz sehr sorgfältigen Auswaschens des Essigäthers mit Wasser Harnstoff in demselben, wenn auch in geringer Menge, zurückbleibt.

Diese geringe Harnstoffmenge ist aber grofs genug, um bei einer Stickstoffbestimmung das Resultat nicht unbeträchtlich zu beeinflussen.

Wir kommen also zu dem Ergebnis, dafs das Bunge-Schmiedebergsche Verfahren überall da anzuwenden ist, wo reichlich Hippursäure vorhanden ist, dort aber, wo dieses versagt, kann man innerhalb einer Versuchsreihe mit Hülfe der Salkowski-Blumenthalschen Methode noch brauchbare Vergleichswerte erhalten.

Berichtigung.

Irrtümlicherweise ist in der Mitteilung von M. Herzog: „Liefert das Pankreas u. s. w.“ in Band II dieser Beiträge S. 111 die Überschrift: „Eigene Versuche“ an die Spitze der Seite gestellt worden, statt unter den ersten Absatz vor die Worte: „Die näher mitzuteilenden Versuche u. s. w.“

Infolge dieses Versehens erscheint der erste Absatz: „Meine eigenen Versuche“ bis „aufzufassen hätte“ als Meinungsäufserung des Verfassers, während er thatsächlich nur eine Fortsetzung des auf S. 110 angeführten wörtlichen Citates aus dem Buche von K. Oppenheimer „Die Fermente“ S. 298 darstellt.

XX.

Über jodierte Spaltungsprodukte des Eiweifses.

Von A. Oswald.

(Aus dem chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik in Zürich.)

1. Einleitung.

Durch die in den neunziger Jahren rasch nacheinander erfolgte Entdeckung von natürlich vorkommenden jodhaltigen Proteinstoffen bezw. von deren Spaltungsprodukten, als: dem Jodothyrin durch E. Baumann*), der Jodgorgosäure durch Drechsel**), dem Jodospongin durch Hundeshagen***), ist die Aufmerksamkeit der Chemiker auf die Gewinnung und Untersuchung der bis dahin kaum beachteten Jodeiweifsverbindungen gelenkt worden. Dies geschah um so mehr, als der künstlichen Darstellung dieser Stoffe von verschiedener Seite eine praktische Bedeutung beigemessen wurde. Es erschienen in rascher Aufeinanderfolge zahlreiche einschlägige Abhandlungen.

F. Blum†) liefs Chlor, Brom und Jod in der Kälte oder bei gelindem Erwärmen auf feuchtes Eiweifs einwirken, wobei er reichliche Bildung von Halogenwasserstoff beobachtete. Wie der Autor ausdrücklich hervorhebt, sind die erhaltenen Körper als Halogensubstitutionsprodukte der Eiweifskörper aufzufassen.

*) Über das normale Vorkommen von Jod im Tierkörper. I. Mitteilung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 21, 319 (1895) und II. Mitteilung ebend. 21, 481 (1896).

**) Beiträge zur Chemie einiger Seetiere. Über das Achsenskelett von Gorgonia Cavolinii. Zeitschr. f. Biolog. 33, 90 (1896).

***) Über jodhaltige Spongien und Jodospongin. Zeitschr. f. angew. Chemie 1895, 473, cit. nach Malys Jahresbericht für Tierchemie 25, 394; Chem. Centralbl. 1895, II, 570.

†) Über synthetisch dargestellte Specifica. Verhandlg. des Kongr. f. innere Medizin, 1897.

Ähnliche Präparate scheint Renault*) für ärztliche Zwecke hergestellt zu haben. Lépinois**) versetzte Milch mit Jodlösung und fällte das gebildete Jodkasein mit Essigsäure; das Produkt enthielt 21,6 Proz. Jod in fester Bindung.

Liebrecht***) vermengte nach dem von ihm und Röhmann benutzten Verfahren bei Wasserbadtemperatur Kasein und Jod und erhielt dabei einen Körper, das „Perjodkasein“, der 17,8 Proz. Jod enthielt, wovon jedoch der gröfste Teil locker gebunden war. Bei Behandlung mit unterschwefligsaurem Natron ging das Produkt in „Jodkasein“ über, das 5,7 Proz. Jod einschlofs und in trockenem Zustande ein weifses Pulver darstellte. In ähnlicher Weise wie Baumann das Jodothyrin aus der Schilddrüse gewonnen hatte (mehrstündiges Kochen mit 10proz. Schwefelsäure), stellte Liebrecht aus dem Jodkasein das Kaseojodin dar, das 8,5 bis 9,3 Proz. Jod enthält.

Später stellte F. G. Hopkins†) aus verdünntem globulinfreien Hühnereiweifs durch Einwirkung von Jod bei 40 bis 45° Jodalbumin dar mit einem Gehalt von 6,2 Proz. Jod. Mit Alkohol konnte er demselben in geringer Menge Verbindungen entziehen, welche 17,99 Proz. Jod enthielten.

F. Hofmeister††) jodierte als erster reines krystallisiertes Eieralbumin. Er erzielte eine maximale Jodaufnahme, indem er im Wasserbade auf eine wässerige Eiweifslösung eine Mischung von Jodkalium, Kaliumjodat und Schwefelsäure mehrere Stunden einwirken liefs. Der Jodgehalt des dabei erhaltenen Produktes betrug 8,9 Proz. Hofmeister nimmt an, dafs je zwei Atome Jod auf ein Atom Schwefel in das Eiweifsmolekül eintreten.

Alsdann folgte eine Publikation von Blum und Vaubel†††), welche die Eiweifskörper in lauwarmer, 40° nicht übersteigender Lösung mit Jodjodkalium bei Anwesenheit von Natriumbikarbonat jodierten. Letzteres hatte den Zweck, den bei der Substitution ge-

---

*) Cit. nach Hofmeister (s. weiter unten ††).

**) Journ. de pharmacie et de chimie [6] 5, 561 (1897).

***) Über Jodderivate von Eiweifskörpern. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30, 1824 (1897).

†) Untersuchung über die Einwirkung der Halogene auf Eiweifs. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30, 1860 (1897).

††) Untersuchungen über Proteinstoffe. Über jodiertes Eieralbumin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 24. 159 (1898).

†††) Über Halogeneiweifsderivate. Journ. f. prakt. Chem. N. F. 57, 365 (1898).

bildeten Jodwasserstoff, welcher die weitere Einwirkung des Jods hindert, zu beseitigen. Auf diese Weise stellten sie Verbindungen des Jods mit verschiedenen Eiweifskörpern dar. Der Jodgehalt derselben betrug 6 bis 11 Proz.

Bei schwach saurer Reaktion jodierten F. G. Hopkins und St. N. Pinkus*) Eiweifsstoffe und erhielten Produkte mit 6,3 Proz. Jod.

Unter der Leitung von F. Hofmeister führte D. Kurajeff**) unter Einhaltung verschiedener Versuchsbedingungen Jod in Serumalbumin und krystallisiertes Eieralbumin ein. Er gelangte zu Produkten, die bis 12,3 Proz. (Jodserumalbumin) bezw. 8,5 Proz. Jod (Jodovalbumin) enthielten. Später jodierte derselbe Autor***) Oxyhämoglobin und Hämatin. Ersteres nahm bis 12,5 Proz. Jod, letzteres bis 14,3 Proz. Jod auf.

Fast alle diese Autoren begnügten sich damit, das Jod in die Eiweifskörper einzuführen und die erhaltenen, womöglich ad maximum jodierten Verbindungen der Elementaranalyse zu unterwerfen. Diese Art der Untersuchung, auf mehrere Eiweifskörper ausgedehnt, förderte das eine Resultat zu Tage, dafs die verschiedenen Eiweifsstoffe ganz ungleiche Mengen von Jod aufzunehmen imstande sind, dafs jedoch jeder derselben unter Einhaltung der gleichen Versuchsbedingungen, abgesehen von geringen Schwankungen, stets die gleiche Jodmenge zu binden vermag. Daraus folgt, dafs die Verschiedenheiten im Jodbindungsvermögen als Ausdruck von Verschiedenheiten in Bau und Zusammensetzung der Eiweifsmoleküle aufgefafst werden müssen. Eine solche Annahme steht mit anderweitigen Untersuchungen der letzten Jahre im Einklang, aus welchen hervorgeht, dafs die verschiedenen Eiweifsarten in ihrem Bau ganz erheblich differieren.

Da wir aber gerade durch diese Untersuchungen über den Bau der Eiweifskörper bedeutend aufgeklärt worden sind und dieselben als Verbindungen kennen gelernt haben, welche bei ganz abweichender Art der Spaltung (wobei jedoch immer hydrolytische Vorgänge im Spiele sind) in eine relativ kleine Anzahl gut charakterisierter Atomgruppen zerfallen, die gleichsam die Bausteine des Moleküls darstellen, so erschien mir der Versuch, die aus dem

*) Zur Kenntnis der Einwirkung von Halogenen auf Proteine. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 31, 1312 (1898).

**) Über Einführung von Jod in das krystallisierte Serum- und Eieralbumin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 462 (1899).

***) Über das Jodprodukt des Oxyhämoglobins. Daselbst 31, 527 (1901).

Eiweifsmolekül abspaltbare noch unbekannte jodbindende Atomgruppe zu isolieren, nicht aussichtslos.

Freilich mufste ich mich von vornherein auf das eventuelle Mifslingen dieses Unternehmens gefafst machen, falls das Jod sich an solchen Stellen anlagerte, wo die „präformierten“ Atomgruppen miteinander verankert sind. Da es nicht ausgeschlossen ist, dafs es sich hier, wenigstens zum Teil, um lockere Doppelbindungen handelt, so wäre denkbar, dafs gerade diese Stellen besonders günstige Angriffspunkte für das Jod bieten könnten. Wir wissen jedoch, dafs das Jod sicher teilweise durch Substitution von Wasserstoffatomen in das Molekül eintritt, so dafs diese Eventualität nicht gerade zu befürchten stand.

Das Freiwerden von Jod, wie es Drechsel*) bei der Aufspaltung des Gorgonins und ich bei der Zersetzung des Thyreoglobulins mit siedender Salzsäure beobachtet haben, zeigt immerhin zur Genüge, wie leicht das Jod aus den natürlichen Jodeiweifskörpern abspaltbar ist.

Von den früheren Autoren haben sich nur wenige damit beschäftigt, Jodeiweifs zum Zweck der Auffindung des jodbindenden Komplexes in seine Komponenten zu zerlegen.

Hundeshagen**) hatte aus der (jodhaltigen) Hornmasse verschiedener Spongien jodorganische Spaltungsprodukte in Form ihrer unlöslichen Metallsalze isoliert, die aber nicht einheitlich waren. Er sprach sie als jodierte Aminosäuren, Jodaminofettsäuren oder Jodtyrosine an. Leider war mir die Mitteilung von Hundeshagen im Original nicht zugänglich, so dafs ich über die Art der Aufspaltung des Spongins nichts Näheres habe erfahren können.

Ein Jahr darauf stellte Drechsel***) aus dem Gorgonin, dem eiweifsartigen Bestandteil des Achsenskelettes einer Koralle (Gorgonia Cavolinii) durch Spalten mit siedendem Barytwasser eine krystallisierbare Verbindung, die Jodgorgosäure, dar, die er auf Grund ihrer elementaren Zusammensetzung für Jodaminobuttersäure erklärte. Es sei jedoch bemerkt, dafs die Spaltung mittels Barytwasser einen tieferen Zerfall bewirkt als die mittels Säuren bezw. Fermenten, indem durch die Wirkung des Baryts einzelne Endprodukte der Säure- bezw. Fermentspaltung, wie Arginin und

*) loc. cit.
**) loc. cit.
***) loc. cit.

vielleicht auch Histidin, noch weiter abgebaut werden (Schulze und Winterstein*), Steudel**). Für eine solche Wirkung spricht auch das Vorkommen von Produkten bei der Barytspaltung, wie Essigsäure, Oxalsäure und Kohlensäure, welche, wie Drechsel***) hervorhebt, bei der Zerlegung mittels Säuren nicht, oder wenigstens in geringerer Menge auftreten. Im Hinblick hierauf ist, selbst wenn Drechsels Auffassung der Jodgorgosäure als einer Jodaminobuttersäure sich als richtig herausstellen sollte, die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, dafs sie ein weiteres, sekundäres Abbauprodukt einer anderen, komplizierteren Verbindung darstellt.

Die Gewinnung des Jodothyrins durch Baumann†) aus dem Schilddrüseneiweifs, dem später von mir isolierten Thyreoglobulin, zeigte, dafs das Jod an einen gegen die Wirkung spaltender Agentien widerstandsfähigen Komplex des Eiweifsmoleküles gebunden ist. Über den Bau desselben gab die Elementaranalyse wegen des noch sehr hohen (aus dem Jodgehalt††) berechneten) Molekulargewichtes keinen genaueren Aufschlufs. Es handelt sich aber zweifellos entweder um ein Gemenge verschiedener Stoffe (worunter vielleicht auch „melaninartige“†††) oder eine sehr komplizierte Verbindung, die nur durch Zerlegung in einfachere Körper näher charakterisiert werden kann.

Ich will gleich hier einschalten, dafs Versuche, die ich in dieser Richtung unternommen habe, wegen der Schwierigkeit der Beschaffung genügenden Ausgangsmateriales zu keinem befriedigenden Resultate geführt haben.

Durch mehrstündiges bis mehrtägiges Behandeln mit siedendem konzentrierten Barytwasser liefs sich das Jodothyrin vollständig zerlegen. Aus dem klaren, weingelben, vom Baryt befreiten Filtrat krystallisierte etwas Leucin aus, die davon getrennte Mutterlauge gab auf Zusatz von Silber- oder Quecksilbersalzen einen weifsen, sowohl in verdünntem Ammoniak, wie in verdünnten Säuren leicht löslichen Niederschlag, der, abfiltriert und mit Schwefel-

*) Bildung von Ornithin bei der Spaltung des Arginins. Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 1 (1898).

**) Zur Kenntnis der Spaltung von Eiweifskörpern. I. Mitteilung. Ebend. 35, 540 (1902).

***) Citiert nach Hammarstens Lehrb. d. physiol. Chem. 1895, S. 18.

†) loc. cit.

††) Derselbe betrug im Maximum 14 Proz.

†††) Die „Melanine“ binden Jod. In Schmiedebergs Melanoidinsäure — aus rohem Hühnereiweifs dargestellt — habe ich 2,16 Proz. Jod einführen können.

wasserstoff von Metall befreit, eine wasser- und alkohollösliche jodreiche Verbindung darstellte. Aus den sorgfältig gereinigten, mehrere Male umgefällten, äufserst geringen Rückständen erhielt ich jedoch nur Sirupe, die sich selbst nach mehrmonatlichem Stehen im Exsikkator der Krystallisation unzugänglich erwiesen. Sie gaben intensive Xanthoproteinreaktion und entwickelten beim Schmelzen mit Ätznatron Geruch nach Skatol. Mit Phosphorwolframsäure gaben sie keinen Niederschlag. Die Probe mit Millons Reagens fiel negativ aus (Jodothyrin giebt auch keine Millonsche Reaktion). Durch Zusatz von rauchender Salpetersäure wurde Jod entbunden, nicht aber durch verdünnte Salpetersäure unter gleichzeitigem Zufügen von salpetriger Säure.

Dem Jodothyrin ist seiner Darstellungsweise nach das schon erwähnte Kaseojodin analog, welches Liebrecht*) aus Jodkasein erhielt, ebenso das von Harnack**) aus Spongin erhaltene Jodospongin und Blums***) „Jodalbacid", von dem unten noch die Rede sein soll†). Diese Körper stellen aber insgesamt wie das Jodothyrin noch Gemenge oder hochmolekulare Verbindungen dar, über deren Bau sich einstweilen nichts aussagen läfst.

Auf Grund des negativen Ausfalles der Millonschen Reaktion beim Jodeiweifs ist von mehreren Seiten [Hofmeister††), später Blum und Vaubel†††)], die Ansicht ausgesprochen worden, dafs das Jod in das Tyrosin eintritt. Letztere Autoren betonen besonders, dafs das Jod nicht die Stelle des Hydroxyls einnimmt, sondern „demselben benachbart in den Benzolkern eintritt", da es ihnen gelungen sei, nach Wegnahme des Halogens durch Erhitzen unter Druck den positiven Ausfall der Millonschen Reaktion wieder zu erlangen.

Die gleichen Autoren unterwarfen das Jodeiweifs der Spaltung mit Alkali und fanden dabei, dafs durch die Einwirkung ver-

*) Über Jodderivate von Eiweifskörpern. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 30, 1824 (1897).

**) Über das Jodospongin, die jodhaltige eiweifsartige Substanz aus dem Badeschwamm. Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 412 (1898).

***) Über den Halogenstoffwechsel und seine Bedeutung für den Organismus. Münch. med. Wochenschr. 1898, Nr. 8 u. 9.

†) Ich hebe ausdrücklich hervor, dafs sich die Analogie zwischen diesen Körpern und Jodothyrin blofs auf die Darstellungsweise und einige chemische Merkmale bezieht. Die Körper sind in ihren physiologischen Eigenschaften ganz verschieden vom Jodothyrin.

††) loc. cit.

†††) loc. cit.

dünnter (5 proz.) Natronlauge auf dem Wasserbade die Eiweifskörper in verschiedene Fraktionen zerfallen, von welchen die eine, in verdünnter Essigsäure unlösliche, 13,5 Proz. Jod, eine andere in absolutem Alkohol unlösliche 7 Proz. Jod, eine dritte, schwefelreiche, kein Jod aufnimmt. Eine nähere Charakterisierung der Produkte fehlt.

Bei der Spaltung durch Alkaliwirkung erhielten sie ferner aus Kasein und Eierklar Produkte, welche 13 bis 15 Proz. Jod aufnahmen, während ungespaltenes Eiweifs und Kasein 6 bis 7 Proz. Jod zu binden vermögen. Diese Zunahme des Jodbindungsvermögens deute auf eine Verminderung der Molekulargröfse. Die Autoren haben auch für Pepton (aus Hühnereiweifs) zum Teil ein höheres Jodbindungsvermögen (7 bis 15 Proz. Jod) gefunden als für die Albumosen aus dem käuflichen Witte-Pepton (11,3 Proz. Jod). Es mag jedoch bemerkt werden, dafs auf Grund Blums eigener Befunde der Vergleich von Spaltungsprodukten zweier so verschiedener Eiweifskörper, wie des Peptons aus Hühnereiweifs und der Albumosen aus Fibrin (Witte-Pepton), kaum zu Schlufsfolgerungen berechtigt.

2. Spaltungsversuche mit Jodeiweifs.

Den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen bildete ursprünglich die Beobachtung Hofmeisters*), dafs bei der Spaltung des Jodalbumins mit siedenden verdünnten Säuren eine in konzentrierten Mineralsäuren schwer lösliche, in Alkali und auch etwas in Alkohol lösliche Substanz entsteht, welche sehr jodreich ist und bezüglich ihrer äufseren Merkmale in mehrfacher Beziehung an Baumanns Jodothyrin erinnert.

Ich hatte mir auf Veranlassung von Prof. Hofmeister in dessen Laboratorium zur Aufgabe gemacht, diese jodreiche Verbindung näher zu charakterisieren und womöglich auch gleichzeitig den Ort, wo das Jod in das Eiweifsmolekül eintritt, zu bestimmen. Diese Untersuchungen mufste ich aber bald nach ihrem Beginne wegen anderweitiger Inanspruchnahme aufgeben.

Die Resultate, zu welchen ich damals gekommen war, sind kurz folgende:

Der vom [nach Hofmeister**)] jodierten Eiweifs bei 4- bis 5 stündigem Kochen mit 10 proz. Mineralsäuren hinterlassene

*) loc. cit.
**) loc. cit.

Rückstand ist löslich in Alkali, unlöslich in Säuren. Er löst sich in noch feuchtem Zustande zum Teil in Alkohol, zum Teil ist er unlöslich darin. Der alkohollösliche Teil entspricht in betreff seiner Darstellungsweise und seiner äuſseren Merkmale dem Jodothyrin. Er giebt wie letzteres die Alkaloidreaktionen (Fällbarkeit durch Phosphorwolfram- und Phosphormolybdänsäure, Jodquecksilberkalium u. s. w.), ferner die Xanthoproteinreaktion, unterscheidet sich aber wesentlich davon, indem er die Biuretreaktion giebt und die physiologischen Eigenschaften des Jodothyrins nicht besitzt. Sowohl die Millonsche, wie die Adamkieviczsche und die Molischsche Reaktion fallen negativ aus. Er enthält keinen bleischwärzenden, wohl aber fest gebundenen Schwefel. Seine Zusammensetzung ist keine konstante. Auch verringerte sich die Ausbeute beträchtlich bei längerem Kochen der sauren Lösung. Drei Präparate ergaben bei der Analyse folgenden Jod- und Stickstoffgehalt:

Präparat I	3,01	Proz.	J	10,91	Proz.	N
	3,7	„	J			
Präparat II	11,5	„	J	12,93	„	N
Präparat III	9,88	„	J	11,86	„	N*)

Wie ersichtlich, schwankte der Jodgehalt ganz auſserordentlich (zwischen 3,0 und 11,5 Proz.), auch der Stickstoffgehalt der drei Präparate differierte (um 2 Proz.). Es war nicht zu ermitteln, worauf diese Schwankungen im Jodgehalte beruhen.

So weit haben sich meine Untersuchungen über das Jodeiweiſs im Hofmeisterschen Laboratorium erstreckt. Wegen der Inkonstanz der Zusammensetzung wurde der Körper nicht weiter untersucht.

Anscheinend derselbe Körper ist inzwischen von F. Blum**) beschrieben und unter dem Namen „Jodalbacid“ als Surrogat für Schilddrüsenpräparate empfohlen worden.

Später, nachdem ich das Thyreoglobulin kennen gelernt hatte, bemühte ich mich, aus dieser natürlichen Jodeiweiſsverbindung die

---

*) Analytische Belege:

0,0332 g	Substanz gaben	0,001 g	Jod	=	3,01	Proz.	J.
0,0420 g	„ „	0,00154 g	„	=	3,7	„	J.
0,0651 g	„ „	0,007546 g	„	=	11,5	„	J.
0,0553 g	„ „	0,005467 g	„	=	9,88	„	J.
0,0994 g	„ „	0,01085 g	N	=	10,91	„	N.
0,1056 g	„ „	0,0126 g	N	=	11,93	„	N.
0,1021 g	„ „	0,01211 g	N	=	11,86	„	N.

**) loc. cit.

jodhaltige Gruppe abzuspalten, kam aber wegen Mangels an geeignetem Materiale*) nicht zum Ziele. Ich wandte mich daher wieder den künstlich jodierten Eiweifskörpern zu, die in beliebiger Menge leicht zu beschaffen sind.

Ich versuchte zuerst, eine Spaltung des Jodeiweifses durch mehrstündiges Sieden mit konzentrierter Salzsäure zu erzielen, gab aber dieses Verfahren auf, als ich bemerkte, dafs hierdurch ähnlich wie bei der Zersetzung des Gorgonins und des Thyreoglobulins Jod in Freiheit gesetzt wird.

Ich nahm daher meine Zuflucht zur Spaltung mit Alkalien und wählte in Anlehnung an Drechsels Versuche über Gorgonin das Barytwasser.

Das Jodeiweifs (aus rohem Hühnereiweifs) wurde mit siedendem Barytwasser so lange erhitzt, bis die Lösung die Biuretreaktion nicht mehr gab, was mehrere Tage in Anspruch nahm. Aus der filtrierten, klaren, weingelben Flüssigkeit liefs sich nach Entfernung der basischen Produkte durch Phosphorwolframsäurezusatz mit Hülfe von Silbernitrat eine Fraktion isolieren, welche viel organisch gebundenes Jod enthielt. Der Körper war auch fällbar durch Quecksilbersalze, dagegen nicht durch Kupfersalze. Der Silber- bezw. Quecksilberniederschlag war leicht löslich in verdünntem Ammoniak und verdünnten Säuren (auch Salpetersäure), konnte aber durch vorsichtiges Neutralisieren wieder aus der Lösung gefällt werden. Durch Benutzung dieser Eigenschaft wurde versucht, den Jodkörper von Beimengungen zu befreien. Nach der Entfernung des Silbers mit Schwefelwasserstoff oder mit der gerade notwendigen Menge Salzsäure wurde ein Teil der wässerigen Lösung mit Äther überschichtet, ein anderer bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Es schieden sich jedoch aus letzterem, selbst nach mehrwöchentlichem Stehen im Exsikkator, keine Krystalle aus. Eine der Jodgorgosäure ähnliche Verbindung lag also nicht vor.

Beim mehrmonatlichen Stehen über freier Schwefelsäure blieb schliefslich ein gelblicher Firnis übrig, der sich in Form durchsichtiger spröder Lamellen vom Glase abheben liefs und aus der Luft begierig Wasser anzog. Ein anderes Mal sinterte der Sirup zu einer dunkelbraunen klebrigen Masse zusammen, die sich im Vakuumexsikkator aufblähte und schliefslich zu einer spröden Masse erstarrte. Der Jodkörper erinnerte in seinem Verhalten an

*) Die mir zur Verfügung stehenden Schilddrüsen waren fast sämtlich kropfig entartet und lieferten daher äufserst jodarme Thyreoglobulinpräparate, die zu einer sehr unbefriedigenden Ausbeute führten.



das von Hopkins und Pinkus*) aus dem Siegfriedschen Antipepton erhaltene Bromierungsprodukt.

Der eingetrocknete Sirup löste sich leicht in Alkohol von 95 Proz., dagegen nicht in Aceton, Essigäther, Chloroform, Benzol. Er enthielt 23,08 Proz. Jod. Zu einer weiteren Charakterisierung des Produktes reichte die äufserst geringe Ausbeute nicht aus, nur so viel konnte ich ermitteln, dafs es beim Schmelzen mit Alkali keinen Skatol- bezw. Indolgeruch entwickelte. Der Körper liefs sich nicht benzoylieren; auch beim Ansäuern der Reaktionsflüssigkeit schied sich kein Niederschlag aus.

In der Hoffnung, dafs vielleicht durch eine weniger tiefgreifende Zersetzung, als sie die Spaltung durch Barytwirkung darstellt**), ein fafsbares Produkt zu erreichen wäre, habe ich Jodeiweifs und später Jodprotalbumose der Trypsinverdauung unterworfen, letztere wegen ihrer leichten und glatten Zersetzbarkeit durch Trypsin [E. P. Pick***)]. Ein analysierbares Produkt vermochte ich jedoch auch auf diese Weise nicht zu gewinnen.

Da ich angesichts dieser negativen Resultate nicht erwarten konnte, auf dem Wege der Spaltung zu einem reinen Produkte zu gelangen, und mir die Lösung der uns interessierenden Frage auf diese Weise nicht möglich schien†), so änderte ich die Fragestellung. Ich spaltete zuerst die Eiweifskörper und jodierte erst nachher die einzelnen Bruchstücke. Aus ihrer Jodaufnahmefähigkeit und der Gröfse derselben im Verein mit ihrem sonstigen reaktionellen Verhalten hoffte ich einen Schlufs auf die Zusammensetzung und die Natur des jodbindenden Komplexes ziehen zu können.

Zuerst zog ich als gelindes Spaltungsmittel das Pepsin heran, welches relativ hochmolekulare, noch Eiweifscharakter darbietende Spaltungsprodukte liefert, und wählte für meine Versuche das käufliche Witte-Pepton, über dessen Bestandteile wir durch verschiedene Arbeiten, namentlich die von E. P. Pick††) in mehrfacher Beziehung aufgeklärt sind. Besonders genauen Aufschlufs verdanken wir diesem Autor über die Zusammensetzung zweier Be-

*) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 31, 1325 (1898).

**) Vgl. weiter oben.

***) Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. Zeitschrift f. physiol. Chem. 28, 219 (1899).

†) Auch das Thyreoglobulin habe ich auf die geschilderte Weise zerlegt. Über diese Versuche werde ich in einer anderen Mitteilung berichten.

††) loc. cit. und vgl. weiter unten.

standteile desselben, der Protalbumose und der Heteroalbumose*). Aus dem Vergleich meiner Befunde mit denjenigen Picks, betreffend die beiden Körper, erhoffte ich daher ganz besonders Aufklärung über die hier aufgeworfene Frage. Was die übrigen Albumosen und die Peptone anbelangt, so stand zu erwarten, dafs mit der Tiefe der Spaltung das Jodbindungsvermögen sich ändern würde, indem die die jodbindende Gruppe enthaltenden Fraktionen mehr, die übrigen weniger Jod oder gar keins aufzunehmen imstande sein dürften**).

Im nachfolgenden soll über meine in dieser Richtung angestellten Untersuchungen des näheren berichtet werden.

3. Einführung von Jod in die peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins (Witte-Pepton).

A. Darstellung der Albumosen und Peptone.

Die Albumosen und Peptone wurden nach dem von E. P. Pick***) ausgearbeiteten Verfahren voneinander getrennt. Da für die Trennung der Proto- von der Heteroalbumose dieser Autor verschiedene kleine Modifikationen seiner Methode angegeben hat, so sei die von mir gewählte Darstellungsweise dieser beiden Fraktionen kurz geschildert.

Das käufliche Witte-Pepton wurde der Pickschen Vorschrift gemäfs in etwa der zehnfachen Gewichtsmenge warmen Wassers gelöst und am folgenden Tag vom unlöslichen Rückstand abfiltriert. Das klare Filtrat wurde mit der gleichen Menge gesättigter Ammonsulfatlösung versetzt und der nach einiger Zeit zu einem Kuchen zusammengeballte Niederschlag, die primären Albumosen darstellend, von den in Lösung gebliebenen Deuteroalbumosen durch Filtration getrennt. Zur vollständigeren Reinigung wurde der Niederschlag noch einige Male in Wasser gelöst und mit gesättigter Ammonsulfatlösung gefällt, dann gut abgeprefst und in möglichst wenig Wasser gelöst, was am besten

*) Nach Fertigstellung meines Manuskriptes erschien eine ausführliche Mitteilung von Pick über die übrigen Albumosen, die Deuteroalbumosen. Diese Beiträge 2, 481.

**) Nach den Anschauungen der Kühneschen Schule mufste eine dem allmählichen Abbau der Albumosen und der dadurch bedingten Abnahme ihres Molekulargewichtes entsprechende Zunahme des Jodbindungsvermögens erwartet werden. Diese Jodierungsversuche gestalteten sich daher gewissermafsen zum Prüfstein der Kühneschen Theorie über die peptische Spaltung des Eiweifses.

***) Untersuchungen über die Proteinstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 246 (1897) und loc. cit.

in der Wärme geschah. Die etwa 40 proz. Lösung wurde mit dem gleichen Volumen 95 proz. Alkohols versetzt und der dadurch entstandene Niederschlag abfiltriert. Das trübe Filtrat setzte in den nächsten Tagen einen geringen schleimigen Bodensatz ab, während die Lösung sich vollkommen klärte. Sie wurde 8 bis 14 Tage stehen gelassen, nach welcher Zeit sich kein Niederschlag mehr ausschied. Dann wurde auf dem Wasserbad der Alkohol vertrieben. Der entstandene Sirup (die Protalbumose darstellend) wurde in Wasser gelöst und der Jodierung unterworfen.

Der durch den Alkohol erzeugte Niederschlag (aus der Heteroalbumose bestehend) wurde gut abgepreſst, in kochendem Wasser gelöst, vom unlöslichen Rückstand abfiltriert und das Filtrat mit dem doppelten Volumen 95 proz. Alkohols versetzt. Der Niederschlag wurde wiederum in Wasser gelöst und gefällt und diese Prozedur noch 4- bis 5 mal wiederholt. Durch dieses Verfahren verringerte sich die Ausbeute wesentlich, da beim Auflösen des Niederschlags in heiſsem Wasser ein Teil davon sich jedesmal als unlöslich erwies, dafür konnten aber Reste von Protalbumose um so sicherer ausgeschlossen werden.

Daſs in der That die Trennung der Heteroalbumose von der Protalbumose sowie beider primärer Albumosen von den Deuteroalbumosen eine befriedigende war, dafür spricht die mit Picks Befunden übereinstimmende Thatsache, daſs die Protalbumose eine sehr intensive, die Heteroalbumose dagegen keine oder nur eine sehr dürftige Millonsche Reaktion gab, während wiederum die beiden primären Albumosen gänzlich negativen Ausfall der Molischschen Furfurolreaktion zeigten im Gegensatz zu dem Deuteroalbumosengemenge, bei welchem diese Reaktion positiv ausfiel.

Aus dem Filtrat (Filtrat I) der primären Albumosen wurde in der von Pick beschriebenen Weise, durch weiteren Zusatz von gesättigter Ammonsulfatlösung bis zu $^2/_3$-Sättigung die Fraktion *A*, und aus dem Filtrat (II) durch vollständige Sättigung die Fraktion *B* gefällt. Aus dem abermaligen Filtrat (III) wurde endlich durch vorsichtigen, allmählichen Zusatz von mit Ammonsulfat gesättigter, verdünnter Schwefelsäure die Fraktion *C* niedergeschlagen. Zur besseren Abscheidung der Niederschläge wurden die Lösungen vor dem Abfiltrieren stets über Nacht stehen gelassen. Sämtliche drei Fraktionen wurden mehrere Male umgefällt und jedesmal mit den entsprechenden Lösungen ausgewaschen, alsdann in Wasser gelöst und durch anhaltendes Dialysieren zuerst gegen laufendes, dann gegen destilliertes Wasser von den anhaftenden Salzen befreit *).

Aus dem sauren, mit Ammonsulfat gesättigten Filtrat wurden die Peptone nach dem Jodverfahren von Pick gefällt. Ich habe jedoch nur einmal die Trennung der beiden Peptone *A* und *B* durchgeführt, die übrigen Male dagegen das Gemenge beider untersucht, da es mir vorderhand mehr auf das Gesamtgemenge der als Peptone bezeichneten,

*) Inzwischen ist, wie schon erwähnt, eine neue Publikation von Pick erschienen, worin gezeigt wird, daſs diese 3 Albumosenfraktionen sich noch weiter zerlegen lassen. Es soll weiter unten darauf eingegangen werden.

ohnehin noch nicht näher charakterisierten Körper, als auf einzelne daraus darstellbare Fraktionen ankam.

Die schwach saure, ammonsulfatgesättigte Lösung wurde nach Pick mit einer ammonsulfatgesättigten Jodjodkaliumlösung so lange versetzt, bis eine Probe der Flüssigkeit mit salzgesättigter Jodjodkaliumlösung keine Fällung mehr gab. Der rotbraune Niederschlag wurde auf dem Filter gesammelt und mit einer ammonsulfatgesättigten Jodjodkaliumlösung ausgewaschen.

Bei den übrigen Darstellungen wurde die saure salzgesättigte Lösung mit Ammoniak neutralisiert und auf dem Wasserbade eingeengt. Durch abwechselnden Zusatz von Methylalkohol und Einengen der Filtrate wurde das Ammonsulfat entfernt, das Filtrat auf dem Wasserbade zum Sirup eingeengt. Es gab keine Millonsche Reaktion. Der alkoholfreie Sirup wurde mit Wasser verdünnt und der Jodierung unterworfen.

B. Jodierung.

Die Jodierung geschah zum Teil nach dem von Kurajeff*) im Hofmeisterschen Laboratorium angewandten Verfahren, indem die wässerigen Albumosen- bezw. Peptonlösungen mit einem Gemenge von Jod und Jodkalium versetzt und unter Zusatz von Magnesiumkarbonat längere Zeit bei einer Temperatur von 40 bis 50° belassen wurden. Zum Teil wurde unter Einhaltung der gleichen übrigen Versuchsbedingungen an Stelle des Magnesiumkarbonats Natriumbikarbonat verwendet, wie dies Blum und Vaubel**) gethan haben***). Die Resultate waren in beiden Fällen genau die gleichen; ein Unterschied im Jodgehalt der erhaltenen Produkte konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Erhitzung der Lösungen geschah im Wasserbade, dessen Temperatur 40 bis 45° C. betrug†), und dauerte so lange, bis kein Jod mehr gebunden wurde, was nach häufigem Umschütteln nach $^1/_2$ bis $^3/_4$ Stunde der Fall war. Nach dieser Zeit wurde die klare, dunkelbraune Lösung

*) loc cit.

**) loc. cit.

***) Während der Jodierung entweicht anfangs viel Kohlensäure, es mufs daher für einen ständigen Überschufs von Magnesiumkarbonat bezw. Natriumbikarbonat gesorgt werden.

†) Es sei hier ausdrücklich hervorgehoben, dafs bei sämtlichen Jodierungsversuchen die Temperatur des Wasserbades 45° nie überschritt. Wenn diese Mafsregel nicht befolgt wird, so werden die Versuchsbedingungen wesentlich verändert, indem das doppelt kohlensaure Natron gespalten und die Lösung stark alkalisch wird. Unter diesen Umständen erhält man viel jodärmere Produkte. Ich hatte anfangs auf die Einhaltung der Temperatur nicht genau geachtet und daher Präparate mit viel niedrigerem und sehr ungleichem, zwischen 2,4 und 6,9 Proz. schwankendem Jodgehalt erhalten.

in kaltem Wasser abgekühlt, in einen Schlauch von Pergamentpapier gegossen und anfangs gegen laufendes, später gegen destilliertes Wasser dialysiert, bis im Dialysat Jod nicht mehr nachweisbar war, was einige Tage in Anspruch nahm. Dieses Verfahren konnte natürlich nur bei den Albumosen angewendet werden.

Nach Entfernung des überschüssigen Jods und der Jodsalze wurde der Inhalt des Schlauches mit verdünnter Essigsäure angesäuert, wobei die Jodalbumosen in Gestalt fein verteilter, blafsgelber Flocken ausfielen. Dieselben wurden auf einem Seidenfilter gesammelt und behufs rascheren Trocknens mit Alkohol gewaschen. Die bei mäfsiger Wärme getrockneten Präparate wurden im Mörser zerrieben, dann bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Sie stellten ein hellgelbes, nicht hygroskopisches Pulver dar.

Bei der Analysierung der erst erhaltenen Produkte, zu deren Herstellung die Protalbumose gedient hatte, stellte es sich heraus, dafs der Jodgehalt fast um 2 Proz. (von 11,2 Proz. bis 13,1 Proz.) variierte.

Zur Aufklärung dieses Verhaltens wurde die Versuchsanordnung abwechselnd nach verschiedener Richtung hin modifiziert, eine Abhängigkeit des Jodgehalts von irgend einer Versuchsbedingung war jedoch nicht zu ermitteln.

Ich fand z. B. in einem Präparat [III]*) 12,22 Proz. Jod, in einem anderen (VII) 11,44 Proz., in einem dritten (II) 11,53 bezw. 11,24 Proz. Dieselben waren unter Zusatz von Natriumbikarbonat hergestellt. Bei Zusatz von Magnesiumkarbonat fand ich 11,81 Proz. Jod (Präparat IX).

Die erwähnten Präparate waren alle vom überschüssigen Jod durch einfache Dialyse gegen Wasser befreit worden. Ihre Lösung gab auf Zusatz von verdünnter Schwefelsäure und salpetrigsaurem Natron beim Schütteln kein Jod an Chloroform ab. Um sicher zu sein, dafs nicht dennoch locker gebundenes Jod darin vorhanden war, habe ich die Jodalbumosenniederschläge mit Wasser ausgekocht. Dabei erhielt ich aber selbst nach längerem Kochen unter Erneuerung des Wassers keine wesentlichen Unterschiede im Jodgehalt. Ich fand nach zweimaligem Auskochen in einem Präparat (V) 12,38 Proz. bezw. 12,66 Proz. Jod, in einem anderen (VI) nach viermaligem Auskochen 12,15 Proz. Jod. Das sind nicht niedrigere Werte als bei Umgehung des Kochprozesses.

Auch durch öfteres Umfällen mit verdünnter Essigsäure aus verdünnten Alkalien wurden die Jodwerte nicht verändert; so war das oben erwähnte 11,44 Proz. Jod enthaltende Präparat 3 mal, das mit 11,53 Proz. Jod 6 mal umgefällt worden.

Ebenso schien von der Dauer der Jodeinwirkung und des Jodierungsvorganges die Inkonstanz des Jodgehaltes nicht abzuhängen. Durch längeres, bis 12stündiges Stehenlassen der Albumosenlösung im Brutschrank nach beendeter Jodaufnahme von seiten der Albumosen konnte ich eine gesetzmäfsige Veränderung im Jodgehalt nicht nachweisen. Bei Präparat VIII hatte die Jodierung eine halbe Stunde gedauert, bei Präparat X wurde die Jodalbumosenlösung in Gegenwart von über-

*) Siehe weiter unten.

schüssigem Jod 10, bei Präparat XI 20 Stunden im Brutschrank gelassen. Präparat VIII enthielt 13,15 Proz. Jod, Präparat X 13,80 Proz., Präparat XI 13,0 Proz. Jod.

Die Gewinnung der Jodpeptone gestaltete sich etwas schwieriger als die der Jodalbumosen, da selbst auf sehr vorsichtigen Zusatz der Essigsäure aus der (überschüssiges Jod enthaltenden) Lösung nur ein sehr geringer Niederschlag ausfiel, während das Filtrat davon noch sehr intensive Biuretreaktion gab, also noch Pepton enthielt.

Um Wiederholungen zu vermeiden, soll das zur Gewinnung der Jodpeptone gewählte Verfahren im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Analysen weiter unten besprochen werden.

C. Bestimmungsmethoden.

Zur Bestimmung des Jods veraschte ich die Präparate im Nickeltiegel in der früher von mir schon beschriebenen Weise. Anfangs bediente ich mich des Freseniusschen Verfahrens, das sich nach meiner früheren Erfahrung am besten eignet, da, wo es sich um die Bestimmung des Jods neben Chlor handelt*).

Wegen des hohen Jodgehalts der Präparate leistete diese Methode keine guten Dienste, da trotz Anwendung grofser Mengen von Schwefelkohlenstoff letzterer sich stark mit Jod sättigen mufste und daher beim Auswaschen stets eine erhebliche Quantität Jod an die Waschwässer abgab.

Ich habe daher das Volhardsche Verfahren angewendet, mit welchem Hofmeister und später Kurajeff gute Resultate erzielt haben.

Freilich bestehen gegen dieses Verfahren die Einwände, welche mich seinerzeit dazu bewogen hatten, die Freseniussche Methode anzuwenden: es wird dabei mit dem Jod auch das Chlor (der Asche) bestimmt und dadurch ein zu hoher Jodgehalt vorgetäuscht. Die Mitbestimmung des Chlors kann jedoch einen wesentlichen Fehler nur bei solchen Präparaten bedingen, welche im Vergleich zum Jod eine merkliche Menge Chlor enthalten, wie etwa bei sehr jodarmen Eiweifsverbindungen. Dies trifft aber nicht zu bei den in Frage stehenden Jodalbumosen und Jodpeptonen, deren Jodgehalt unvergleichlich höher ist als die in der Asche vorkommende geringe Menge Chlor. Der Fehler betrifft höchstens einen Bruchteil eines Prozents.

Die Bestimmung des Kohlen- und Wasserstoffs geschah in der

*) Die Bemerkung von Blum (Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 345), ich hätte gelegentlich meiner früheren Untersuchungen (ebenda 32, 121) diese Methode aus seiner (Blums) Arbeit „citatlos, aber fast wörtlich übernommen", beruht auf einem Irrtum. Die Methode ist viel älter. Ich habe sie der Anleitung zur quantitativen Analyse von Fresenius, Bd. I, § 145, I b, β (6. Auflage, S. 482) entnommen.



üblichen Weise durch Verbrennen im offenen Rohr mit Kupferoxyd und Bleichromat und vorgelegter Kupferspirale.

Die Bestimmung des Stickstoffs geschah nach Kjeldahl, und die des Schwefels nach dem früher von mir schon mehrfach angewendeten Verfahren.

D. Beschreibung und Zusammensetzung der Präparate.

Die Jodalbumosen stellen im frisch gefällten Zustande einen hellgelben Niederschlag dar, welcher in verdünnten und konzentrierten Alkalien leicht löslich, in verdünnten Säuren dagegen unlöslich ist; sie verhalten sich also in dieser Beziehung wie die ungespaltenen Jodeiweifsverbindungen. Sie zeigen in gleicher Weise wie die von E. P. Pick beschriebenen Albumosen die Farbenreaktionen der Eiweifsstoffe*), mit Ausnahme der Millon- und Adamkieviczschen Reaktion, welche völlig negativ ausfallen.

Verdünnte salpetrige Säure spaltet in saurer Lösung kein Jod ab, wohl aber rauchende Salpetersäure. Auch hierin sind sie also den noch ungespaltenen Jodeiweifskörpern ähnlich [Hofmeister**)]. An Silbernitrat geben sie das Jod nicht ab, sondern verbinden sich damit zu einem in Alkali und verdünnten Säuren löslichen, bei der Neutralisation ausfallenden Niederschlag. Durch Entsilberung werden wieder die ursprünglichen Jodverbindungen erhalten. Sie enthalten keinen bleischwärzenden Schwefel.

Die Elementaranalyse ergab folgende Werte:

1. Jodprotalbumose.

Präparat	I	0,2033 g	Substanz	gaben	0,3462	g	CO_2	=	46,44 Proz.	C
				und	0,1045	„	H_2O	=	5,71 „	H
Präparat	I	0,2130 „	„	gaben	0,03287	„	N	=	15,43 „	N
„	II	0,2003 „	„	„	0,030137	„	N	=	15,04 „	N
„	IV	0,2787 „	„	„	0,0419	„	N	=	15,04 „	N
						im	Mittel:		15,17 Proz.	N
Präparat	I	0,3583 g	Substanz	gaben	0,00515	g	S	=	1,43 Proz.	S
„	II	0,4158 „	„	„	0,006729	„	S	=	1,61 „	S
						im	Mittel:		1,52 Proz.	S
Präparat	I	0,2905 g	Substanz	gaben	0,0359	g	J	=	12,36 Proz.	J
„	I	0,2153 „	„	„	0,02673	„	J	=	12,41 „	J
„	II	0,2109 „	„	„	0,0242	„	J	=	11,24 „	J
„	II	0,3114 „	„	„	0,0359	„	J	=	11,53 „	J
„	III	0,2539 „	„	„	0,03104	„	J	=	12,22 „	J
„	IV	0,1064 „	„	„	0,0137	„	J	=	12,88 „	J

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 24, 246 (1897).

**) loc. cit.

Präparat	V	0,1868 g	Substanz	gaben	0,02365	g	J	=	12,38	Proz.	J
„	VI	0,1540 „	„	„	0,0187	„	J	=	12,15	„	J
„	VII	0,2592 „	„	„	0,02966	„	J	=	11,44	„	J
„	VIII	0,2754 „	„	„	0,03623	„	J	=	13,15	„	J
„	IX	0,2902 „	„	„	0,03429	„	J	=	11,81	„	J
„	X	0,2626 „	„	„	0,03658	„	J	=	13,93	„	J
„	X	0,2787 „	„	„	0,03847	„	J	=	13,80	„	J
„	XI	0,1488 „	„	„	0,01934	„	J	=	13,00	„	J
						im Mittel:			12,45	Proz.	J
Präparat	I	0,1888 g	Substanz	gaben	0,0002	g	Asche	=	0,10	Proz.	Asche
„	III	0,1440 „	„	„	0,0006	„	„	=	0,41	„	„

2. Jodheteroalbumose.

Präparat	I	0,1775 g	Substanz	gaben	0,2910	g	CO_2	=	44,71	Proz.	C
„	II	0,2155 „	„	„	0,3585	„	CO_2	=	45,37	„	C
						im Mittel:			45,04	Proz.	C
Präparat	I	0,1775 g	Substanz	gaben	0,03897	g	H_2O	=	5,61	Proz.	H
„	II	0,2155 „	„	„	0,1074	„	H_2O	=	5,53	„	H
						im Mittel:			5,57	Proz.	H
Präparat	I	0,1942 g	Substanz	gaben	0,02988	g	N	=	15,37	Proz.	N
„	II	0,1621 „	„	„	0,02564	„	N	=	15,69	„	N
„	III	0,2106 „	„	„	0,03239	„	N	=	15,38	„	N
						im Mittel:			15,48	Proz.	N
Präparat	I	0,2102 g	Substanz	gaben	0,003349	g	S	=	1,59	Proz.	S
„	I	0,1723 „	„	„	0,01555	„	J	=	9,02	„	J
„	II	0,1958 „	„	„	0,01967	„	J	=	10,04	„	J
„	III	0,1363 „	„	„	0,014709	„	J	=	10,79	„	J
„	IV	0,2746 „	„	„	0,0356	„	J	=	12,96	„	J
„	V	0,1569 „	„	„	0,01489	„	J	=	9,49	„	J
„	V	0,1768 „	„	„	0,01614	„	J	=	9,13	„	J
						im Mittel:			10,23	Proz.	J
Präparat	I	0,1178 g	Substanz	gaben	0,0005	g	Asche	=	0,42	Proz.	Asche

3. Jodalbumose der Fraktion A.

Präparat	I	0,2074 g	Substanz	gaben	0,3489	g	CO_2	=	45,87	Proz.	C
„	II	0,1280 „	„	„	0,2219	„	CO_2	=	47,27	„	C
						im Mittel:			46,57	Proz.	C
Präparat	I	0,2074 g	Substanz	gaben	0,1084	g	H_2O	=	5,80	Proz.	H
„	II	0,1280 „	„	„	0,0682	„	H_2O	=	5,92	„	H
						im Mittel:			5,86	Proz.	H
Präparat	I	0,2231 g	Substanz	gaben	0,03427	g	N	=	15,36	Proz.	N
„	II	0,2069 „	„	„	0,03074	„	N	=	14,98	„	N
						im Mittel:			15,17	Proz.	N

Präparat	I	0,2629 g	Substanz	gaben	0,00475	g S	= 1,87	Proz. S
„	II	0,3285 „	„	„	0,00587	„ S	= 1,78	„ S
						im Mittel:	1,82	Proz. S
Präparat	I	0,1834 g	Substanz	gaben	0,0229	g J	= 12,49	Proz. J
„	II	0,1356 „	„	„	0,01639	„ J	= 12,09	„ J
„	II	0,2780 „	„	„	0,0335	„ J	= 12,06	„ J
„	III	0,1448 „	„	„	0,01749	„ J	= 12,08	„ J
						im Mittel:	12,18	Proz. J
Präparat	I	0,1154 g	Substanz	gaben	0,0003	g Asche	= 0,25	Proz. Asche

4. Jodalbumose der Fraktion B.

Präparat	I	0,1306 g	Substanz	gaben	0,2213	g CO_2	= 46,21	Proz. C
				und	0,0709	„ H_2O	= 5,99	„ H
„	I	0,1556 „	„	gaben	0,02343	„ N	= 15,06	„ N
„	I	0,1351 „	„	„	0,00296	„ S	= 1,45	„ S
„	I	0,1231 „	„	„	0,0168	„ J	= 13,65	„ J
„	I	0,1944 „	„	„	0,02722	„ J	= 14,00	„ J
„	II	0,1417 „	„	„	0,02209	„ J	= 15,59	„ J
„	III	0,1301 „	„	„	0,01894	„ J	= 14,55	„ J
„	IV	0,1657 „	„	„	0,02509	„ J	= 15,14	„ J
						im Mittel:	14,58	Proz. J
Präparat	I	0,1202 g	Substanz	gaben	0,0008	g Asche	= 0,66	Proz. Asche

5. Jodalbumose der Fraktion C.

Präparat	I	0,1288 g	Substanz	gaben	0,2168	g CO_2	= 46,32	Proz. C
				und	0,1288	„ H_2O	= 6,48	„ H
„	I	0,1645 „	„	gaben	0,001769	„ S	= 1,07	„ S
„	I	0,1753 „	„	„	0,025716	„ J	= 14,67	„ J
„	I	0,0957 „	„	„	0,0011	„ Asche*)	= 1,40	„ Asche

Es möge hier noch auf einen Befund aufmerksam gemacht werden. Wie schon erwähnt, sind die Jodalbumosen durch Ausfällen mit verdünnter Essigsäure aus ihrer Lösung gewonnen worden. Dadurch wird jedoch nicht die gesamte Eiweifsmenge gefällt, denn das Filtrat giebt noch Biuretreaktion. Versucht man durch vorsichtigen Zusatz von Essigsäure weiterhin Albumosen daraus niederzuschlagen, so gelingt dies keineswegs. Dagegen fällt Alkohol einen weifsen feinflockigen Niederschlag. Derselbe giebt die gleichen Eiweifsreaktionen wie die Albumosen, enthält jedoch regelmäfsig viel weniger Jod als letztere. Ich fand darin, z. B. im Rückstand der Joddeuteroalbumose, C, 4,55, 4,79 und

*) Zu einer Stickstoffbestimmung reichten die Präparate nicht mehr aus. Diese Fraktion war bei sämtlichen Darstellungen sehr spärlich vertreten.

8,05 Proz. Jod*), während Joddeuteroalbumose C, wie oben gezeigt, 14,67 Proz. Jod enthält.

Dafs es sich um einen ungenügend jodierten Teil der Albumosen handle, ist nicht wohl anzunehmen, denn ich habe diese Körper auch aus solchen Lösungen darstellen können, welche längere Zeit (mehrere Stunden) bei Bruttemperatur mit einem Überschufs von Jod in Berührung geblieben waren.

Vielleicht stellen diese Körper durch die Wirkung des Jodes (Oxydation?) abgesprengte Bruchstücke der Albumosen dar, welche sich vor den Albumosen durch ein geringeres Jodbindungsvermögen auszeichnen und infolge ihres geringeren Jodgehaltes weniger saure Eigenschaften besitzen, daher durch Säuren nicht niedergeschlagen werden. Dafs eine solche Veränderung der Eiweifsstoffe bei der Jodierung stattfindet, wird weiter unten gezeigt werden.

Nicht zu verwerfen ist die Annahme, dafs diese Körper schon von vornherein in den Albumosenniederschlägen vorhanden waren und den Fraktionen entsprechen, welche E. P. Pick mit Hülfe seines Alkoholverfahrens daraus isolieren konnte. Es mufs jedoch hervorgehoben werden, dafs ein gleiches jodarmes Produkt auch aus dem Filtrat der Jodproto- und Jodheteroalbumose erhalten wurde.

6. Jodpeptone.

Eine vollständige Elementaranalyse der Jodpeptone habe ich nicht ausgeführt, da ich eine solche in Anbetracht des Umstandes, dafs ich von dem nicht weiter getrennten Peptongemenge ausgegangen war, für wertlos hielt. Andererseits lieferte die nach Pick einmal durchgeführte Trennung der Peptone A und B eine so geringe Ausbeute, dafs sie für eine vollständige Analyse bei weitem nicht ausreichte.

Zur Isolierung der Jodpeptone verfuhr ich folgendermafsen:

Zuerst jodierte ich das vom Ammonsulfat in der geschilderten Weise (vgl. S. 403) befreite Gesamtgemenge der Peptone. Die Jodierung geschah wie bei den Albumosen. Nach erfolgter Jodaufnahme schied sich jedoch selbst auf sehr sorgfältigen Zusatz von verdünnter Essigsäure**) nur ein sehr geringer brauner Niederschlag aus. Derselbe, abfiltriert, mehrere Male in verdünnter Natronlauge gelöst, mit verdünnter Essigsäure gefällt und bis zum Verschwinden des freien Jodes mit Wasser gewaschen, enthielt im

*) Analytische Belege:

0,1730 g Substanz gaben	0,00787 g Jod	=	4,55	Proz. J.
0,1809 „ „ „	0,01456 „ „	=	8,05	„ J.
0,2248 „ „ „	0,01077 „ „	=	4,79	„ J.

**) Der Zusatz der Säure mufs sehr vorsichtig geschehen, da der Niederschlag in einem geringen Überschufs der Säure löslich ist.

trockenen Zustande 20,34 Proz. Jod*). Er gab keine Biuretreaktion. Damit ist erwiesen, dafs unter den Produkten der Pepsinverdauung ein Körper vorhanden ist, der die Fähigkeit, Jod zu binden, besitzt, aber weder albumose- noch peptonartiger Natur ist.

Erwähnt mag werden, dafs ich diesen Körper nicht bei jedem Jodierungsversuch habe erhalten können, bisweilen blieb die Jodpeptonlösung auf Säurezusatz vollkommen klar.

Das Filtrat des Essigsäureniederschlages gab sehr intensive, rotviolette Biuretreaktion, enthielt also die Peptone. Die Darstellung derselben in einer die Analyse lohnenden Form gelang nicht.

Zur Gewinnung derselben wurde eine Probe des sauren Filtrates mit Silbernitrat versetzt. Das Jodsilber (die Lösung enthielt viel überschüssiges Jod) wurde abfiltriert, das Filtrat mit Schwefelwasserstoff entsilbert und nach sorgfältigem Neutralisieren mit Ammoniak auf dem Wasserbade eingeengt. Der Sirup gab starke Biuret- und Xanthoproteinreaktion, erwies sich jedoch als jodfrei. Die Peptone hatten also, falls sie Jod überhaupt gebunden hatten, dasselbe an Silbernitrat abgegeben. Jodverbindungen, welche an Silbernitrat ihr Jod abgeben, sind bekannt; stellte es sich heraus, dafs die Jodpeptone zu diesen gehörten, so würden sie sich von den Jodalbumosen, welche das Jod in festerer Bindung halten, wesentlich unterscheiden.

Zur Aufklärung dieser Frage wurde eine Peptonlösung nach der Jodierung mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit Phosphorwolframsäure versetzt. Der abfiltrierte und gut gewaschene Niederschlag, welcher intensive Biuretreaktion gab, wurde in der gewöhnlichen Weise mit Baryt zersetzt und aus dem Filtrat der überschüssige Baryt durch Einleiten von Kohlensäure und nachherigen Zusatz von Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat wurde bei neutraler Reaktion eingeengt und die dickflüssige Lösung mit Alkohol und Aceton gefällt. Die Fällung war unvollständig; das Filtrat gab noch intensive Biuretreaktion. Der Niederschlag enthielt 5,25 Proz. Jod, daneben aber noch sehr viel Asche [52,2 Proz.**)], die sich als jodfrei erwies***).

Die Peptone vermögen also Jod zu binden; wieviel sie aufzunehmen imstande sind, bleibt in Anbetracht der Unreinheit des Präparates einstweilen noch unentschieden.

Bemerkenswert ist, dafs die Jodpeptone im Gegensatz zu den Jodalbumosen durch Säuren nicht gefällt werden; ob der Mindergehalt an

---

*) 0,1161 g gaben 0,02362 g Jod = 20,34 Proz. J.
0,1231 „ „ 24,78 „ J. [in letzterem 2,52 Proz. (jodfreie) Asche].

**) 0,5709 g Substanz gaben 0,02997 g Jod = 5,25 Proz. Jod.
0,1132 „ „ „ 0,0591 „ Asche = 52,2 „ Asche

***) Sie bestand zum gröfsten Teil aus Barytsalzen.

Jod daran schuld ist, insofern als durch den Eintritt von weniger negativen Jodatomen der Säurecharakter nur einen geringeren Grad erreicht, mag dahingestellt bleiben.

Bei der Jodierung eines zweiten Peptonpräparates, und des Peptones A (Pick) kam ich zu ähnlichen Resultaten.

Die auf aschefreie Substanz berechneten Mittelwerte der untersuchten Präparate sind in folgender Tabelle übersichtlich zusammengestellt.

	Jodprot-albu-mose	Jod-hetero-albumose	Jod-albumose A	Jod-albumose B	Jod-albumose C	Jod-pep-tone	Unbekannter die Biuret-reaktion nicht geben-der Jod-körper
C	46,55	45,22	46,58	46,51	46,97		
H	5,72	5,59	5,87	6,02	6,57		
N	15,20	15,54	15,20	15,16	—		
J	12,48	10,27	12,21	14,67	14,87	(10,98)	20,33 22,79*)
S	1,52	1,59	1,82	1,45	1,07		
(O)	(18,53)	(21,79)	(18,32)	(16,19)	—		

4. Besprechung der Resultate.

Aus der Durchsicht obiger Tabelle ergiebt sich, dafs die Jodwerte der verschiedenen Albumosen, zum Teil wenigstens, nicht unerheblich differieren. So weisen namentlich die drei Körper, welche man sich nach neueren Untersuchungen von E. P. Pick**) und E. Zunz***) bei der Verdauung als gleichzeitig und primär aus dem Eiweifsmolekül entstanden zu denken hat, die Protalbumose, die Heteroalbumose und die Albumose B, einen verschiedenen Jodgehalt auf, die Protalbumose 12,48 Proz. Jod, die Heteroalbumose 10,27 Proz. Jod, die Albumose B 14,67 Proz. Jod.

Da diese Ziffern die Mittelwerte aus zahlreichen Bestimmungen darstellen, so dürfen sie nicht, etwa im Hinblick auf die recht erheblichen Schwankungen der Werte der einzelnen Präparate, als zufällige betrachtet werden.

---

*) Der Aschegehalt konnte wegen Mangel an Material nicht bestimmt werden, war aber ganz unbeträchtlich.

**) loc. cit.

***) Über den quantitativen Verlauf der peptischen Eiweifsspaltung. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 132 (1899).

Ein grofser Unterschied besteht namentlich zwischen der Heteroalbumose und der Albumose B, der Jodgehalt der letzteren übertrifft den der Heteroalbumose um beinahe die Hälfte.

Die beiden übrigen Albumosen zeigen wiederum Werte, welche den schon erwähnten gleichkommen, die Albumose A den gleichen wie die Protalbumose, die Albumose C den gleichen wie die Albumose B*).

Was die Peptone anbelangt, so bedarf die gefundene Ziffer (10,98 Proz. Jod auf aschefreie Substanz berechnet) noch der Bestätigung, bevor irgend welche Schlüsse daraus gezogen werden können, da es mir bisher nicht gelang, die Präparate von der ihnen anhaftenden grofsen Menge von Salzen zu befreien.

Bemerkenswert ist das Auffinden eines die Biuretreaktion nicht gebenden sehr jodreichen Körpers (20 bis 22 Proz. Jod). Auf das Vorkommen solcher jenseit der Peptonstufe stehenden Spaltungsprodukte im Pepsinverdauungsgemisch der Eiweifskörper ist schon von verschiedener Seite [Lawrow**), Zunz***), Pfaundler†), Langstein††) u. s. w. aufmerksam gemacht worden†††)]. Die sehr geringe Ausbeute gestattete mir nicht festzustellen, ob der erwähnte jodbindende Stoff eins der schon isolierten Endprodukte oder einen noch unbekannten Körper darstellt. Nur das eine vermochte ich neben seiner Löslichkeit in Alkalien und Unlöslichkeit in verdünnten Säuren nachzuweisen, dafs er sehr starke Xanthoproteinreaktion giebt.

Besonders auffallend ist die Thatsache, dafs die Heteroalbumose und die in ihrem Bau davon so abweichende Protalbumose einen

*) Es ist selbstverständlich zu erwarten, dafs die Unterschiede im Jodgehalt bei den von E. P. Pick neuerdings beschriebenen, in ihrer Zusammensetzung beträchtlich voneinander abweichenden Albumosenfraktionen, wie die Thioalbumose und die Glykoalbumose, sich viel gröfser gestalten. Ebenso beruht die Ähnlichkeit im Jodgehalt einzelner Albumosen vielleicht nur auf der Verunreinigung mit der Nachbarfraktion. Es ist anzunehmen, dafs dies der Fall ist für Albumose C.

**) Zur Kenntnis des Chemismus der peptischen und tryptischen Verdauung der Eiweifsstoffe. Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 513 (1898).

***) loc. cit.

†) Zur Kenntnis der Endprodukte der Pepsinverdauung. Ebenda 30, 90 (1900).

††) Zur Kenntnis der Endprodukte der peptischen Verdauung. Diese Beiträge 1, 507 (1902).

†††) Ob diese Wirkung dem Pepsin oder einem beigemengten Fermente (Erepsin oder Trypsin) zugeschrieben werden mufs, ist hier nicht der Ort zu erörtern.

relativ so wenig (um 2 Proz.) verschiedenen Jodgehalt aufweisen. Daraus lassen sich Schlüsse von allgemeiner Bedeutung für die Jodeiweifskörper, nämlich über die anfangs aufgeworfene Frage, die Natur der jodbindenden Gruppe des Eiweifsmoleküles betreffend, ziehen.

Wie aus den eingehenden Untersuchungen von E. P. Pick*) hervorgeht, zeichnet sich die Heteroalbumose dadurch aus, dafs sie sehr viel Diaminosäuren und nur wenig Monaminosäuren enthält, bei der Kalischmelze keinen Geruch nach Skatol oder Indol entwickelt, bei der Trypsinverdauung nur wenig Proteinochromogen entstehen läfst, nur sehr dürftige Millonsche Reaktion giebt und dementsprechend bei der Aufspaltung nur sehr wenig Tyrosin liefert, während die Protalbumose relativ weniger Eiweifsbasen enthält, bei der Kalischmelze sehr intensiven Indol- und Skatolgeruch entwickelt, sehr viel Proteinochromogen liefert, äufserst intensive Millonsche Reaktion giebt und sehr reich an Tyrosin ist.

Wenn daher trotz dieser ganz verschiedenen Zusammensetzung beide Körper einen beinahe gleichen Jodgehalt aufweisen, so geht, vor allem mit Rücksicht auf den verschiedenen Tyrosingehalt, daraus hervor, dafs das Jod sich nicht ausschliefslich, wenn überhaupt, an das Tyrosin anlagert. Ebenso dürfte es sich nicht ausschliefslich mit dem indolliefernden Komplexe verankern**).

E. P. Pick hat die Beobachtung gemacht, dafs bei der Oxydation der Heteroalbumose mit Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung Benzoesäure entsteht, und dadurch das Vorkommen eines aromatischen Komplexes auch in der Heteroalbumose erwiesen. Er spricht die Vermutung aus, dafs die hydroxylierte, Benzoesäure liefernde Phenylgruppe das von Schulze und Barbieri***) aufgefundene, neuerdings von E. Fischer†) und seinen Mitarbeitern aus vielen Eiweifsarten gewonnene Phenylalanin sei.

*) loc. cit.

**) In einer späteren Mitteilung werde ich zeigen können, dafs sich auch auf andere Weise der Beweis erbringen läfst, dafs das Tyrosin nicht die einzige jodbindende Gruppe darstellt.

***) Bildung von Phenylamidopropionsäure beim Erhitzen von Eiweifsstoffen mit Salzsäure und Zinnchlorür. Ber. d. deutsch. chem. Ges. 16, 1711 und: Über Phenylamidopropionsäure, Amidovaleriansäure u. s. w. Journ. f. prakt. Chem. 27, 337 (1883).

†) Über die Entstehung von α-Pyrrolidinkarbonsäure und Phenylalanin bei der Hydrolyse des Eieralbumins. Zeitschr. f. physiol. Chem. 33, 412 (1901) und: Über die Hydrolyse des Leims. Ebenda 35, 70 (1902).

Wenn es sich herausstellt, dafs thatsächlich der aromatische Komplex die jodbindende Gruppe darstellt, wofür ja, wie schon verschiedene Autoren hervorgehoben haben, das negative Ausfallen der Millonschen Reaktion nach der Jodierung zu sprechen scheint, so dürfte in der Heteroalbumose das Phenylalanin oder eine andere nicht hydroxylierte Phenylgruppe diese Rolle übernehmen.

Es ist schon erwähnt worden, dafs die Albumose A den gleichen Jodgehalt aufweist wie die Protalbumose, und die Albumose C den gleichen wie die Albumose B. Ob dies nur Zufall ist oder vielleicht auf einem genetischen Zusammenhang beruht, läfst sich auf Grund des vorliegenden Materiales nicht entscheiden. Es sei nur erwähnt, dafs auch Pick*) die Frage einer genetischen Beziehung der Albumose A zu den primären Albumosen (Proto- und Heteroalbumosen) aufwirft, ohne jedoch die Möglichkeit auszuschliefsen, dafs die Albumose A ein primäres Spaltungsprodukt darstelle.

Dafs die Albumose C aus einer anderen Albumose hervorgeht, d. h. sekundär entsteht, ist sowohl durch Pick wie durch Zunz nachgewiesen worden, ihre Abstammung von der Fraktion B ist freilich nur unter gleichzeitiger Abspaltung eines Kohlehydratkomplexes verständlich.

Auf die Ähnlichkeit der Protalbumose und Albumose A nicht nur in betreff ihres Jodgehaltes, sondern hinsichtlich der ganzen übrigen Zusammensetzung will ich nicht näher eingehen, da diese Fraktion nach Picks neuesten Untersuchungen ein Gemenge von mindestens zwei Körpern darstellt. Ebenso läfst sich die Fraktion B nach Pick in drei Körper zerlegen**).

In Übereinstimmung mit Picks Befunden an den nicht jodierten Produkten fand ich die Heteroalbumose etwas kohlenstoff- und wasserstoffärmer, dagegen stickstoffreicher als die Protalbumose. Vergleicht man aber meine Analysenwerte mit denjenigen Picks (siehe Tab., S. 415), so sieht man, dafs die Abnahme des Stickstoffgehaltes annähernd der Jodaufnahme entspricht, dafs dagegen die Abnahme des Kohlenstoffgehaltes eine gröfsere ist, als sich aus dem Eintritt von 12, bezw. 10,27 Proz. Jod berechnen

*) Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. II. Teil. Diese Beiträge 2, 480 (1902).

**) Ich hatte nicht versucht, die ursprünglichen Pickschen Deuteroalbumosen in weitere Fraktionen zu zerlegen, da ich Herrn E. P. Pick mit solchen Versuchen beschäftigt wufste; siehe auch loc. cit.

	Protalbumose	Jodprotalbumose	Heteroalbumose	Jodheteroalbumose
C	55,64	46,55	55,12	45,22
H	6,80	5,72	6,61	5,59
N	17,66	15,20	17,98	15,54
J	—	12,48	—	10,27
S	1,21	1,52	1,22	1,59
O	18,69	18,53	19,07	21,79

läfst. Diese Beobachtung ist auch von Hofmeister*) am Jodalbumin gemacht worden.

Die geringe Abnahme des Stickstoffgehaltes steht im Einklang mit der Beobachtung C. H. L. Schmidts**), welcher bei der Jodierung eine Abspaltung von Amidogruppen aus dem Eiweifsmolekül direkt nachwies. Was dagegen die bedeutende Abnahme des Kohlenstoffgehaltes betrifft, so mufs man mit Hofmeister den Austritt eines kohlenstoffhaltigen, stickstofffreien (oder doch stickstoffarmen) Komplexes annehmen.

Ob das schon erwähnte, durch Säuren nicht fällbare, relativ jodarme Produkt, das sich jedesmal nach Entfernung der Jodalbumosen aus dem Filtrat durch Fällung mit Alkohol gewinnen läfst, diesen abgespaltenen Komplex darstellt, ist vorderhand nicht zu sagen. Das Produkt enthält freilich noch Stickstoff und giebt sogar noch Eiweifsreaktionen, dies spricht jedoch nicht gegen die Annahme, dafs es (durch Oxydation?) aus den Albumosen abgespalten worden ist***).

Auffallend ist der hohe Schwefelgehalt meiner Präparate im Vergleiche zu dem der Pickschen Proto- und Heteroalbumosen. Dies spricht auf jeden Fall gegen die Annahme, dafs bei der Jodierung Schwefel abgespalten werde, und steht im Einklang mit Hofmeisters und Kurajeffs Erfahrungen am ungespaltenen Eiweifs.

Überblicken wir diese Jodierungsversuche an Witte-Pepton,

*) loc. cit.

**) Über die Bedeutung der Jodsäurebildung bei der Jodierung des krystallisierten Eieralbumins. Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 55 (1901).

***) Auf einer ungleichen Abspaltung von Teilstücken des Moleküls (durch Oxydation) beruhen vielleicht auch die nicht unbeträchtlichen Schwankungen im Halogengehalt, welche von allen Autoren, welche sich mit der Jodierung (und Bromierung) der Eiweifskörper befafst haben, verzeichnet worden sind.

so ersehen wir daraus, dafs die Jodierung uns ein Mittel an die Hand giebt, die Produkte der Eiweifsspaltung in gewisser Beziehung zu charakterisieren, und uns dadurch einige Anhaltspunkte gewährt zum Verständnis der Art des Abbaues des Eiweifsmoleküls durch die Wirkung des Pepsins*). Vor allem sehen wir, dafs eine regelmäfsige Zunahme des Jodbindungsvermögens der Albumosen, wie sie der Kühneschen Vorstellung von den Vorgängen bei der Pepsinverdauung gemäfs vermutet werden konnte, nicht nachweisbar ist, dafs vielmehr die schon gleich beim Beginn der Verdauung auftretenden Spaltungsprodukte in ihrem Jodbindungsvermögen erheblich voneinander abweichen. In dieser Beziehung stimmen meine Versuche mit den ausführlichen Beobachtungen E. P. Picks überein, aus welchen hervorgeht, dafs schon bei der ersten Einwirkung des Pepsins das Eiweifsmolekül in eine ganze Anzahl ungleicher Produkte zerfällt.

---

*) Es wäre von besonderem Interesse gewesen, festzustellen, wieviel Jod das unverdaute Fibrin aufzunehmen imstande ist; dadurch wäre ein Vergleich in dieser Richtung zwischen dem Fibrin und seinen höheren Spaltungsprodukten möglich gewesen. Leider scheiterten die Versuche an der Unmöglichkeit, das Fibrin in eine lösliche, zur Jodaufnahme geeignete Form zu bringen, ohne gleichzeitig das Molekül anzugreifen.

XXI.

Über Präcipitine und Lysine.

Von cand. med. **Franz Fuhrmann,** Demonstrator am Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Graz.

(Aus dem Institute für allgemeine und experimentelle Pathologie der Universität Graz.)

1.

Die vorliegende Mitteilung berichtet in Kürze über einige Versuche, welche ich auf Anregung des Institutsvorstandes Prof. Klemensiewicz ausführte. Die mir gestellte Aufgabe bestand darin, zu untersuchen, ob die Präcipitinwirkung und Lysinwirkung gewisser Sera an bestimmte Eiweifsfraktionen derselben gebunden sei.

Durch fraktionierte Fällung mit Ammonsulfat haben Spiro und Haake[1]) aus Pferdeblutserum zwei Globulinfraktionen dargestellt. Nach dem Vorschlage von Hofmeister wurde der bei einem Gehalte von 28 bis 33 Proz. $(NH_4)_2SO_4$ ausfallende Körper „Euglobulin", der bei einer Sättigung von 34 bis 36 Proz. des Salzes ausfallende Körper „Pseudoglobulin" genannt.

Im Verlaufe von Versuchen über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes kamen Fuld und Spiro unter anderem zu dem Resultate, dafs nur die Lösungen des Euglobulins in Milch eine Gerinnung hervorbringen, während die Pseudoglobulinlösungen nur labhemmende Eigenschaften besitzen.

In ähnlicher Weise verfahrend gelang es Pick[2]), aus dem Serum des gegen Diphtherie immunisierten Pferdes, bei Fällung mit Ammonsulfat bei einem Sättigungsgrade von 38 Proz. einen Niederschlag zu erhalten, welcher den Diphtherie-Heilkörper in ganzer Menge enthielt. Die bei geringerem Gehalte an Ammonsulfat, von 21,5 bis 25,6 Proz., abgeschiedenen Eiweifskörper zeigten keine antitoxischen Wirkungen *).

*) Ein Gehalt von 25,6 Proz. Ammonsulfat entspricht für Zimmertemperatur im allgemeinen einer Drittelsättigung und 38 Proz. einer Halbsättigung mit diesem Salze.

Die Thatsache, dafs das Diphtherieantitoxin nur in einer von den beiden Fraktionen des Diphtherieheilserums enthalten war, benutzte Pick als Wegweiser für die Trennung der beiden oben genannten Eiweifskörper aus Normalserum.

Bei dieser Gelegenheit gelang es Pick, auch den Nachweis zu liefern, dafs die Fällungsgrenzen der beiden Globuline auch in den Seris verschiedener Tierspezies die gleichen sind.

Dafs die Antitoxinwirkung des Diphtherieheilserums an den bei der Dialyse des Serums in Lösung bleibenden Körper gebunden ist, hatten schon früher Marcus [3]) und Seng [4]) gezeigt. Auch Freund und Sternberg [5]) erhielten durch Aussalzen des Diphtherieheilserums mit Magnesiumsulfat oder mit Ammonsulfat bei halber Sättigung eine vollständige Ausbeute an Heilsubstanz im Niederschlage.

Wie früher erwähnt wurde, hat Pick zur Bestimmung der Fällungsgrenzen für die Eiweifskörper des Diphtherieblutserums den Gehalt der Niederschläge an Heilsubstanz benutzt. Er schlofs daraus auf die gleichen Verhältnisse im Normalserum, und so gelang es ihm thatsächlich, aus dem Paraglobulin des Blutserums die beiden von Spiro und Haake dargestellten Eiweifsfraktionen zu erhalten, die sich nicht nur durch die Verschiedenheit der Fällungsgrenzen, sondern auch durch eine Reihe anderer Reaktionen als verschiedene erweisen (vgl. Fuld und Spiro, loc. cit.).

2. Versuche über die Fraktionierung der normalen Sera.

Was nun meine eigenen Versuche anlangt, so wollte ich mir vorerst ein Urteil über die Fällungserscheinungen bilden, welche bei verschiedener Sättigung mit Ammonsulfat in dem Normalserum jener Tiere auftreten, die ich zu den Versuchen verwendete.

Es war von vornherein zu vermuten, dafs die Fällungsgrenzen sich in einem quantitativen Versuche im Normalserum ohne weiteres an der Niederschlagsmenge erkennen lassen müfsten.

Der Versuch wurde in der Art angestellt, dafs kleine, möglichst gleiche Eprouvetten mit steigenden Mengen einer kalt gesättigten Ammonsulfatlösung beschickt wurden*). Durch Zusatz entsprechender

*) Um Änderungen in der Konzentration der Ammonsulfatlösung zu vermeiden, fertigte ich mir eine nach Landolts und Börnsteins chemisch-physikalischen Tabellen bei 10° C. gesättigte Lösung des Salzes an. Nach diesen Tabellen wird 1 g $(NH_4)_2SO_4$ von 1,358 g H_2O bei 10° C. gelöst. Diese Zahlen sind der Berechnung des Prozentgehaltes bei den Versuchen zu Grunde gelegt.



Mengen von destilliertem Wasser wurde die Salzlösung auf einen bestimmten, in den aufeinander folgenden Eprouvetten steigenden Salzgehalt und gleiches Volumen gebracht. Darauf wurde in jedes Röhrchen die gleiche Menge von Blutserum zugesetzt.

Der Prozentgehalt an Ammonsulfat stieg in zehn zum Versuche verwendeten Eprouvetten von 19,24 bis 45,88 Proz. Die Differenz des Salzgehaltes der Lösung betrug somit in zwei benachbarten Röhrchen annähernd 3 Proz.

Bei diesen Versuchen, welche ich mit normalem Blutserum vom Rinde, Pferde, Kaninchen, Meerschweinchen und Schweine anstellte, ergaben sich für die verschiedenen Serumarten die gleichen Verhältnisse.

Das Röhrchen mit dem geringsten Zusatz zeigte keinen Niederschlag, nicht einmal eine Trübung. In den folgenden Röhrchen entstanden Niederschläge, welche mit steigendem Salzgehalte der Flüssigkeit an Masse zunahmen. Diese Zunahme war aber keine gleichmäfsige, dem Salzgehalte proportionale, sondern eine sprungweise. Es zeigten sich deutlich erkennbare jähe Zunahmen der Niederschläge bei einem Salzgehalt von etwa 25 Proz., dann von etwa 34 Proz. und endlich von etwa 45 Proz.

Weit genauere Resultate als die einfache Beurteilung der Niederschlagsmassen gab der Wägungsversuch.

Ich teile hier einen solchen an Rinderserum ausgeführten Wägungsversuch mit, bei dem die Niederschläge abfiltriert und bis zur Gewichtskonstanz bei 40° C. im Vakuum getrocknet worden waren.

Tabelle I.

Nummer	$(NH_4)_2SO_4$ gesättigte Lösung bei 10° C. ccm	H_2O ccm	Rinderserum ccm	Prozentgehalt an $(NH_4)_2SO_4$	Gewicht des Niederschlages in Grammen	Gewichtsdifferenz
1	2,6	5,4	2	19,24	—	—
2	3,0	5,0	2	22,20	0,0533	—
3	3,4	4,6	2	25,16	0,0790	0,0257
4	3,8	4,2	2	28,12	0,2105	0,1315
5	4,2	3,8	2	31,08	0,2203	0,0098
6	4,6	3,4	2	34,04	0,2375	0,0172
7	5,0	3,0	2	37,00	0,3805	0,1430
8	5,4	2,6	2	39,96	0,4850	0,1045
9	5,8	2,2	2	42,92	0,4960	0,0110
10	6,2	1,8	2	45,88	0,6320	0,1360

Auch in diesem Versuche zeigen sich, wie aus dem letzten, bezw. vorletzten Tabellenstabe ohne weiteres ersichtlich ist, drei

Stellen ziemlich jäher Zunahme der Niederschlagsmengen. Diese Stellen entsprechen nach der von mir gewählten Versuchsanordnung einem Prozentgehalte von 28,12, 37,00 und 45,88 an $(NH_4)_2SO_4$.

Diese Versuche bieten eine weitere Stütze für die Annahme der Verschiedenheit von Euglobulin und Pseudoglobulin und stimmen auch mit den Resultaten, welche Fuld und Spiro erhielten, im allgemeinen überein.

Gleiche Resultate erhielt ich bei einem solchen Versuche mit Kaninchenserum.

Ich will nur erwähnen, dafs eine volle Übereinstimmung der Zahlen des Prozentgehaltes schon nach der Anordnung der Versuche nicht zu erwarten war und dafs ich deshalb für die folgenden Versuche 25 Proz., einer Drittelsättigung entsprechend, und 37 Proz., einer Halbsättigung entsprechend, als die Fällungsgrenzen angenommen habe. Diese Zahlen wurden nicht nur deshalb gewählt, weil sie in einzelnen Versuchen thatsächlich die Grenzen darstellten und auch von anderen Untersuchern gewählt wurden, sondern weil sich als Resultat einiger Versuche ergab, dafs der Euglobulinniederschlag innerhalb ziemlich weiter Grenzen, 25 bis 29 Proz., ausfällt. Das kann schon daraus entnommen werden, dafs sich bei Herstellung der Fraktionen I und II in jedem Falle die Quantität des Euglobulins (I) als gröfser erwies denn die des Pseudoglobulins (II). Auch aus der früheren Tabelle läfst sich diese Thatsache erkennen, wenn man aus dem vorletzten Tabellenstabe die Mengen des Euglobulins und Pseudoglobulins ermittelt.

Es ergiebt sich für 28 Proz. Salzgehalt aus 2 cm^3 Serum ein Gehalt von 0,2105 g Euglobulin, für 37 Proz. Salzgehalt ein Gehalt von 0,1700 g (0,3805 — 0,2105) an Pseudoglobulin. Auch hat die Drittelsättigung für sich, dafs dem Euglobulin kein oder nur wenig Pseudoglobulin beigemengt sein dürfte.

3. Versuche über die Präcipitinwirkung der aus Immunserum gewonnenen Fraktionen.

Zu den Versuchen wurden Kaninchen verwendet, welche während einer Woche täglich 2 cm^3 frischer Kuhmilch subkutan erhalten hatten. Das Blutserum der so vorbehandelten Tiere wurde bei Drittel- und Halbsättigung mit Ammonsulfat fraktioniert gefällt. Die abfiltrierten und abgeprefsten Niederschläge wurden, den ursprünglichen Serumquantitäten entsprechend, in 0,85 proz. Kochsalzlösung gelöst, zu den Versuchen verwendet.

Bei einer Temperatur von 8 bis 10° C. aufbewahrt, behielten diese Lösungen, auch ohne Zusatz einer fäulniswidrigen Substanz, mehrere Tage hindurch ihre Wirksamkeit.

Ebenso bereitete ich aus Rinderblutserum Lösungen beider Fraktionen.

Die filtrierten Lösungen der Fraktionen stellten eine schwach opalisierende Flüssigkeit von geringem Gehalte an Ammonsulfat dar, welcher aber in keiner Weise störend die Präcipitinwirkung beeinflufst (vgl. Fuld und Spiro, loc. cit.).

Lösungen von Ammonsulfat jener Konzentration, welche den verwendeten Lösungen der Fraktionen I und II entsprachen, gaben mit Milch, Kaseinlösungen und den übrigen zu den Versuchen verwendeten Flüssigkeiten keinen Niederschlag und keine Trübung. Milch zeigt z. B. erst bei Drittelsättigung mit Ammonsulfat einen Niederschlag.

Die in den Tabellen mitgeteilten Versuchsresultate entsprechen dem Verhalten der Proben nach einstündigem Aufenthalte im Thermostaten bei 35° C.

In Tabelle II teile ich, zunächst des Vergleiches halber, die im hiesigen Laboratorium ausgeführten Versuche von Hamburger[6]) mit, die im allgemeinen die Versuche von Bordet[7]) zur Grundlage hatten, und welche ich auf die Fraktionen I und II des Rinderblutserums ausdehnte.

Die Tabellen III und IV geben die Versuche mit den Fraktionen des normalen und des Laktoserums von Kaninchen wieder.

Tabelle II. Normal- und Laktoserum von Kaninchen.

Übersicht über das Verhalten von Normal- und Laktoserum des Kaninchens gegen verschiedene Eiweifslösungen.

Serum Kaninchen 0,5 ccm	Kaseinlösung 0,25 ccm	Kaseinlösung + $CaCl_2$ 0,25 ccm	Kuhmilch 3 Tropfen	Rinderblutserum 0,25 ccm	Fraktion I v. Rinderserum 0,25 ccm	Fraktion II v. Rinderserum 0,25 ccm	$CaCl_2$-Lösung 0,25 ccm
mit Kuhmilch gespritzt	Niederschlag, Flüssigkeit klar	Niederschlag, Flüssigkeit klar	Niederschlag, Flüssigkeit klar	Spur Niederschlag, Flüssigkeit trüb	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar
normal	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar	allgemeine Trübung	kein Niederschlag, leichte Trübung	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar	kein Niederschlag, Flüssigkeit klar

Tabelle III. Fraktionen des Laktoserums.

Übersicht über die Präcipitinwirkung der aus dem Laktoserum des Kaninchens hergestellten Fraktionen I und II gegenüber fällbaren Eiweißlösungen verschiedener Art.

Fraktionen des Kaninchen-Laktoserums	Kasein-lösung 0,5 ccm	Kaseinlösung + $CaCl_2$ 0,5 ccm	Kuhmilch 3 Tropfen	Rinder-blutserum 0,5 ccm	Fraktion I aus Rinder-blutserum 0,5 ccm	Fraktion II aus Rinder-blutserum 0,5 ccm
I 1 ccm	Flüssigkeit trüb, später klar und Sediment	Flüssigkeit trüb, später klar und Sediment	Flüssigkeit klar, Sediment	Flüssigkeit trüb, später Sediment	Flüssigkeit klar, kein Sediment	Flüssigkeit trüb, kein Sediment
II 1 ccm	Flüssigkeit klar, kein Sediment	Flüssigkeit klar, kein Sediment	allgem. Trübung ohne Sediment	Flüssigkeit klar, kein Sediment	Flüssigkeit wenig getrübt, kein Sediment	Flüssigkeit klar, kein Sediment

Tabelle IV. Fraktionen des Normalserums.

Übersicht über das Verhalten der Fraktionen I und II des Normalserums vom Kaninchen gegenüber verschiedenen Eiweißlösungen.

Fraktion des Kaninchen-Normal-serums	Kasein-lösung 0,5 ccm	Kaseinlösung + $CaCl_2$ 0,5 ccm	Kuhmilch 3 Tropfen	Rinderblut-serum 0,5 ccm	Fraktion I aus Rinder-blutserum 0,5 ccm	Fraktion II aus Rinder-blutserum 0,5 ccm
I 1 ccm	kein Niederschlag, keine Trübung	kein Niederschlag, Trübung später Spur, Niederschlag	kein Niederschlag, Trübung später Spur, Niederschlag	Spur einer Trübung	Trübung	keine Trübung
II 1 ccm	kein Niederschlag, keine Trübung	kein Niederschlag, keine Trübung	allgem. Trübung, kein Niederschlag	keine Trübung	keine Trübung	keine Trübung

Aus der Tabelle II ist ersichtlich, daſs das Laktoserum auf die Fraktionen I und II des Rinderserums keine präcipitierende

Wirkung zu äufsern vermag, während diese Wirkung in Kaseinlösungen, insbesondere in Milch, aber auch im Rinderserum klar ausgesprochen ist. Eine schwach präcipitierende Wirkung auf Rinderserum hat, wie bekannt, auch das Normalserum des Kaninchens.

Aus der Tabelle III ist zu entnehmen, dafs die präcipitierende Wirkung des Laktoserums vom Kaninchen gegenüber Kaseinlösungen, Milch und Normal-Rinderserum an die Fraktion I oder den Euglobulin-Niederschlag des Laktoserums vom Kaninchen gebunden ist.

Ob die wirksame Substanz, das Präcipitin, aus dem Laktoserum genau ebenso wie das Euglobulin selbst durch fraktionierte Fällung zu gewinnen ist, oder ob in dieser Hinsicht eine Divergenz besteht, das sollen weitere quantitative Versuche erörtern. Zur Anstellung dieser mangelte mir vorläufig das entsprechende Quantum von Laktoserum. Doch ergiebt sich aus meinen Versuchen, dafs bei Drittelsättigung mit Ammonsulfat aus dem Laktoserum die ganze Präcipitinmenge ausgefällt ist.

Solche quantitativen Versuche sollen auch über die Wirkungen der Fraktionen des Laktoserums auf die Fraktionen des Rinderserums Aufschlufs geben.

Fraktion I des Laktoserums giebt nämlich mit Fraktion II des Normal-Rinderserums eine Trübung (Tab. III). Ebenso giebt Fraktion I des Normal-Kaninchenserums mit Fraktion I des Normal-Rinderserums eine Trübung (Tab. IV). Auch die Fraktion II des Laktoserums (Tab. III), welche für Kaseinlösungen, Milch und Normal-Rinderserum ebenso unwirksam ist wie Fraktion II des Normalserums vom Kaninchen (Tab. IV), giebt mit Fraktion I des Rinderserums eine Trübung (Tab. III).

Wie aus Tabelle II ersichtlich ist, wird Normal-Rinderserum durch Normal-Kaninchenserum spurweise getrübt. Diese geringe Präcipitinwirkung kommt auch der Fraktion I (dem Euglobulin) des Normalserums (Tab. IV) und, wie schon erwähnt, in erhöhtem Mafse der Fraktion I des Laktoserums zu (Tab. III).

4. Versuche über die Lysinwirkung der aus dem Serum gewonnenen Fraktionen.

Nach dem Vorgange von Ehrlich und Morgenroth erhielten zur Erlangung eines wirksamen Serums Kaninchen fünf Tage hindurch täglich 2 ccm defibrinierten Rinderblutes subkutan.

Das von den Kaninchen gewonnene Serum wurde wie in den vorerwähnten Versuchen durch Drittel- und Halbsättigung mit Ammonsulfat in Fraktionen getrennt, welche, in 0,85 proz. Kochsalzlösung gelöst, zu den Versuchen verwendet wurden.

Um den Gehalt der Fraktionen I und II an Ammonsulfat zu eliminieren, verwendete ich in späteren Versuchen dialysierte Lösungen derselben, welche nachträglich wieder auf einen Salzgehalt von 0,85 Proz. ClNa gebracht waren.

Aus dem Filtrate von Fraktion II stellte ich durch Eintragen von krystallisiertem Ammonsulfat bis zur völligen Sättigung eine Fraktion III dar, welche ebenfalls dialysiert und, in 0,85 proz. Kochsalzlösung aufgelöst, zu den Versuchen verwendet wurde.

Die zur Erkennung der Lysinwirkung nötige Erythrocytenaufschwemmung wurde, wie üblich, im Verhältnisse von 5 Blut zu 100 Kochsalzlösung von 0,85 Proz. Salzgehalt hergestellt.

Es ist eine bekannte Thatsache, dafs auch das Normalserum bestimmter Tierspezies gegenüber dem Blute anderer Tiere eine nicht unbeträchtliche Lysinwirkung zu äufsern vermag. Durch die Untersuchungen von Ehrlich und Morgenroth sind auch derartige Fälle bei Versuchen mit Blut verschiedener Tiere derselben Art bekannt geworden (Isolyse). Es ist deshalb von besonderer Wichtigkeit, die verschiedenen zu den Versuchen zu verwendenden Blutsorten in dieser Hinsicht genau zu prüfen.

So findet man z. B., dafs Kaninchen-Normalserum energisch hämolytisch wirkt auf Schweine- und Pferdeblut, nicht aber auf Rinderblut. Die hämolytische Wirkung, welche das Normalserum des Kaninchens auf die Blutkörperchen des Schweines äufsert, ist in Bezug auf ihre Intensität in verschiedenen Versuchen wechselnd.

Haben Kaninchen Rinderblut subkutan eingespritzt erhalten, so zeigt sich das gewonnene Kaninchenserum (Rinderblut-Immunserum des Kaninchens) hämolytisch gegenüber dem Rinderblute, aber Blutkörperchen des Schweines und des Pferdes werden davon entweder gar nicht oder nur sehr spärlich gelöst.

Werden aus einem Versuche, in welchem Schweine- oder Pferdeblutkörperchen vom Kaninchenserum nicht gelöst wurden, die Blutkörperchen abcentrifugiert, gewaschen und nun mit Schweine- bezw. Pferdeblutserum behandelt, so findet ebenfalls keine Hämolyse statt. Diese auffällige Thatsache kann in sehr mannigfaltiger Weise gedeutet werden, doch begnüge ich mich, dieselbe vorläufig zu konstatieren, und verschiebe eine Deutung derselben, bis

ich durch weiter fortgesetzte Versuche über ein reicheres Material verfüge.

Wie schon früher erwähnt wurde, habe ich die aus dem Blutserum dargestellten Fraktionen der Dialyse unterworfen, was sich als dringend nötig erwies, da auch sehr geringe Spuren von Ammonsulfat dem Zustandekommen der Hämolyse hinderlich sind. Ein Beispiel dafür ist die Thatsache, daſs Rinderblut-Immunserum des Kaninchens, welches Erythrocyten des Rindes energisch löst, durch Zusatz äuſserst geringer Mengen von Ammonsulfat dieser Wirkung sofort beraubt wird.

Um die Übersicht über die Lysinversuche zu erleichtern, führe ich von jeder Art derselben einen an und werde daran die Besprechung der Resultate anschlieſsen.

Vorerst gebe ich eine Tabelle der ersten sieben Versuchsreihen, zu der ich nur bemerke, daſs unter Fraktion I, II und III das Dialysat aus Rinderblut-Immunserum vom Kaninchen zu verstehen ist. Als Komplement wurde Normal-Kaninchenserum verwendet. RBJS bedeutet in dieser Tabelle V Rinderblut-Immunserum vom Kaninchen. Als Erythrocytenaufschwemmung wurden in allen Versuchen, wie erwähnt, Rinderblutkörperchen, gewaschen und in Kochsalzlösung aufgeschwemmt, verwendet.

Tabelle V.

Versuchsnummer	Fraktion I ccm	Fraktion II ccm	Fraktion III ccm	RBJS ccm	Komplement ccm	Erythrocytensuspension ccm	Hämolysis
I	0,2	—	—	—	—	1	0
II	0,2	—	—	—	0,1	1	kaum merkliche Spur von Hämolyse
III	—	0.2	—	—	—	1	0
IV	—	0,2	—	—	0,1	1	Hämolyse
V	—	—	0,2	—	—	1	0
VI	—	—	0,2	—	0,1	1	0
VII	—	—	—	0,2	—	1	Hämolyse

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daſs der Pseudoglobulinniederschlag (Fraktion II) des Immunserums vom Kaninchen auf die Erythrocyten des Rindes stark lösend wirkt (Versuch IV). Ebenso wirkt, wenn auch weniger stark, der Euglobulinniederschlag (Fraktion I, Versuch II). Die Fraktion III dagegen erweist sich sowohl ohne als auch mit Zusatz von Kaninchen-Normalserum als völlig unwirksam.

Im Sinne von Ehrlichs Theorie könnte man annehmen, dafs an Fraktion III weder ein Immunkörper (Lysin) noch ein Komplement gebunden ist. Andererseits werden aber die Resultate der Versuche V und VI auch schon durch die Abwesenheit des Immunkörpers allein erklärt. Dafs aber in diesem Falle thatsächlich beide Substanzen mangeln, wird durch weitere Versuche bewiesen.

Werden nämlich die Blutkörperchen, welche in Versuch V und VI ungelöst blieben, durch Centrifugieren und Waschen mit Kochsalzlösung (0,85 Proz.) von den Zusatzflüssigkeiten befreit, so erweisen sie sich auch auf Zusatz von neuem Normalserum vom Kaninchen als nicht löslich. Also ist kein Immunkörper vorhanden. Wird die Lösung der Fraktion III mit präparierten (mit Immunkörper beladenen) Rindererythrocyten zusammengebracht, so erweist sie sich auch als unwirksam. Also ist kein für Rindererythrocyten wirksames Komplement vorhanden.

Versuch VIII.

Wurden die in den Versuchen I, II und III der Tabelle V ungelöst gebliebenen Blutkörperchen durch Centrifugieren und Waschen mit Kochsalzlösung von den in den Versuchen verwendeten Flüssigkeiten befreit und in Kochsalzaufschwemmung mit einem Tropfen Normalserum vom Kaninchen versetzt, so erhielt ich in allen drei Fällen innerhalb weniger Minuten völlige Lösung der Erythrocyten.

Der Versuch IV (Tab. V), im Sinne der Ehrlichschen Theorie erörtert, läfst erkennen, dafs die Fraktion II sich ähnlich verhält wie ein inaktiviertes Lysinserum, was durch den Versuch VIII bestätigt wird.

In demselben Sinne aufgefafst, ergiebt der Versuch II, dafs zwar ein Immunkörper vorhanden ist, der aber auf Zusatz geringer Mengen von Komplement nicht oder nicht vollkommen komplettiert wird, da nur spurweise Hämolyse auftritt. Das kann auch in der Weise gedeutet werden, dafs eine die Hämolyse hemmende Substanz vorhanden ist. Weitere Versuche werden erweisen, dafs diese letztere Ansicht, welche zur Annahme eines Antikomplementes in Fraktion I führt, die wahrscheinlichere ist.

So viel ist aber sicher, dafs in den Versuchen I, II und III die Blutkörperchen im Sinne Ehrlichs mit dem Immunkörper (Amboceptor) beladen erscheinen; das geht aus Versuch III hervor.

An Stelle des Normalserums des Kaninchens habe ich in einigen Versuchen auch die aus dem Normalserum hergestellten und durch Dialyse gereinigten Fraktionen benutzt, um eine all-

fällige Komplementwirkung derselben zu konstatieren. Die Fraktionen des Kaninchen-Normalserums erwiesen sich aber in dieser Hinsicht als völlig unwirksam.

Zum Nachweise des Antikomplementes in den Fraktionslösungen habe ich eine Reihe von Versuchen ausgeführt, welche in Tabelle VI wiedergegeben sind. Es wurden die aus den Versuchen I, II, III, V und VI der Tab. V stammenden, abcentrifugierten Flüssigkeiten verwendet und auf ihre hämolytische Wirkung geprüft.

Tabelle VI.

Versuchsnummer	Rinderblut	RBJS	Flüssigkeit v. Versuchsnummer aus Tab. V					I. Fraktion des Lysinserums inaktiv	Komplement	
			I	II	III	V	VI			
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	
IX	1	0,2	1	—	—	—	—	—	—	keine Hämolyse
X	1	0,2	—	1	—	—	—	—	—	Hämolyse
XI	1	0,2	—	—	1	—	—	—	—	Hämolyse
XII	1	0,2	—	—	—	1	—	—	—	Hämolyse
XIII	1	0,2	—	—	—	—	1	—	—	Hämolyse
XIV	1	—	—	—	—	—	—	0,2	0,1	Hämolyse

Zu dieser Tabelle sei nur noch bemerkt, daſs unter Fraktion I des Lysinserums inaktiv die $^1/_2$ Stunde auf 56° C. gehaltene Fraktion I desselben Rinderblut-Immunserums vom Kaninchen zu verstehen ist, welches auch zu den Versuchen IX bis XIII verwendet wurde.

Aus diesen Versuchen ersehen wir, daſs durch die Fraktion I des RBJS (Lysinserums) thatsächlich eine Behinderung der Lysinwirkung auftritt, welche hemmende Wirkung durch Erwärmen dieser Fraktionslösung auf 56° C. (Inaktivierung) verschwindet. Es erscheint mir deshalb gerechtfertigt, diese Thatsache im Sinne der Ehrlichschen Theorie durch die Anwesenheit eines Antikomplementes zu erklären.

In Bezug auf diese Hemmungswirkung, welche ich schon der Kürze wegen als Antikomplementwirkung bezeichnen will, ist folgendes bemerkenswert.

Das Antikomplement ist gegenüber der Anwesenheit von Ammonsulfat in den zur Fraktionierung verwendeten Konzentrationsgraden unempfindlich. Wie schon früher erwähnt wurde, sind

die Immunsera in Bezug auf ihre hämolytischen Wirkungen gegenüber dem Gehalte an Ammonsulfat sehr empfindlich, und dasselbe gilt selbstverständlich auch für deren Fraktionen (s. S. 425).

Während aus den Versuchen in Tabelle VI sich eine an Fraktion I des Rinderblut-Immunserums gebundene Antikomplementwirkung ergiebt, ist für Fraktion II und III nichts derartiges nachweisbar.

Dafs solche Antikomplementwirkungen gelegentlich zu beobachten sind, ist bekannt. So berichten Ehrlich und Morgenroth[8]) über den Mangel jeder hämolytischen Wirkung eines Rinderblut-Immunserums des Kaninchens auf Rinderblut (Ochsenblut). Auch die von Ehrlich versuchte Komplettierung mit überschüssigem Kaninchenserum war erfolglos. Aber nach Zusatz frischen Normalserums des Kaninchens als Komplement wurden die abcentrifugierten Rinderblutkörperchen sofort und vollständig gelöst. Diese Versuche erklären Ehrlich und Morgenroth in der Weise, dafs Komplement fehlte und aufserdem Antikomplement vorhanden war.

Das von mir verwendete Immunserum (Lysinserum) war imstande, Rinderblutkörperchen, im Verhältnisse von 0,1 Serum zu 16 bis 18 Blutkörperchenaufschwemmung, in einer Stunde vollständig zu lösen. Es war also eine von Haus aus kaum merkliche hemmende Wirkung auf den hämolytischen Vorgang zu bemerken. Wurde aber das Lysinserum mit Ammonsulfat gefällt und Fraktion I zu den Versuchen benutzt, so trat die hemmende Wirkung in den Vordergrund (Antikomplement). Wie schon oben erwähnt wurde, ist diese Erscheinung auf die Ausschaltung der Komplementwirkung durch die Behandlung mit Ammonsulfat zurückzuführen.

Für die Erklärung dieser Erscheinung wäre noch die Ansicht von Lipstein[9]), welche er in seinen Untersuchungen als Komplementablenkung bezeichnet hat, in Betracht zu ziehen.

Gegen die Lipsteinsche Auffassung einer Ablenkung der Komplementwirkung durch überschüssige Amboceptoren mit bestimmtem Aviditätsverhältnisse spricht die Thermolabilität des Antikomplementes, die sich aus meinen Versuchen ergiebt. Eine Vernichtung oder Änderung des für eine „Ablenkung" der Komplementwirkung nötigen Amboceptorenüberschusses ergiebt sich aus meinen Versuchen nicht. Eine solche Vernichtung oder Änderung müfste dann durch das Erwärmen auf 56° C. zu stande kommen, was aber der bekannten Stabilität der Immunkörper gegen diese Temperatur widerspricht.

5. Präcipitine in den Fraktionen des Lysinserums.

Wird das Lysinserum in der früher angegebenen Weise durch Ammonsulfat gefällt und die beiden Fraktionen des Euglobulins und Pseudoglobulins dargestellt, so zeigt sich in Versuchen mit Kasein- und anderen Eiweifslösungen eine Präcipitinwirkung. Diese Präcipitinwirkung ist an die Fraktion I (Euglobulin) gebunden und ist unabhängig von dem Gehalte der Fraktionslösungen an den geringen Mengen von Ammonsulfat, welche in nicht dialysierten Lösungen enthalten sind.

Tabelle VII giebt eine Übersicht über derartige Versuche.

Tabelle VII.

Fraktion des Lysinserums, 1 ccm	Kaseinlösung + $CaCl_2$ 0,5 ccm	Kuhmilch, 3 Tropfen	Fraktion I vom Rinderserum, 0,5 ccm	Fraktion II vom Rinderserum, 0,5 ccm	Rinderserum, 0,5 ccm
Fraktion I	Trübung, später Spur Niederschlag	mäfsiger Niederschlag	Spur Trübung	klar	Trübung
Fraktion II	klar	allgemeine Trübung, ohne Sediment	klar	Spur Trübung	klar

6. Versuche über die Wirkung der Immunisierung von Tieren mit der Euglobulin- und Pseudoglobulinfraktion.

Die Versuche gingen darauf aus, zu konstatieren, ob durch die Injektion der Euglobulin- und Pseudoglobulinfraktion bei Tieren spezifische Präcipitine entstehen. Es ist selbstverständlich, dafs ich zu diesen Versuchen sowohl bei der Einspritzung als auch bei den Präcipitinversuchen dieselben Lösungen der Fraktionen benutzte.

Derartige Versuche haben Landsteiner und Calvo [10]) angestellt. Diese Forscher benutzten Lösungen der Fraktionen I und II sowie von Serumalbumin aus dem Normalserum des Pferdes zur Einspritzung und erhielten negative Resultate in Bezug auf die Spezifität der Präcipitinwirkung. Es erzeugte nämlich das nach Einspritzung von Fraktion I des Pferdeserums gewonnene Immunserum in allen Fraktionen des normalen Pferdeserums ein Präcipitat, aber dieses war am stärksten mit Fraktion I des Pferde-

normalserums. Ähnlich verhielt sich das Immunserum von Fraktion II gegenüber den Fraktionen des Pferdenormalserums.

Ich verwendete Fraktion I und II des Normal-Rinderserums, welche, in 0,85 Proz. Kochsalzlösung in möglichst grofsen Mengen gelöst, einer Reihe von Meerschweinchen in Dosen von 1 ccm täglich eine Woche hindurch in die Bauchhöhle injiziert wurden.

Das Serum der mit einer der beiden Fraktionen vorbehandelten Tiere gab mit beiden Fraktionen des Normal-Rinderserums und mit Normal-Rinderserum einen Niederschlag. Es ist jedoch zu beachten, dafs die Trennung der Fraktion I und II möglicherweise keine quantitative war, so dafs hieraus ein ganz sicherer Schlufs gegen die spezifische Wirkungsweise der erhaltenen Präcipitine noch nicht gezogen werden kann*). Ausschlaggebender ist, dafs auch die Kuhmilch, und zwar hauptsächlich durch das Immunserum von Fraktion I, zum Gerinnen gebracht wurde, eine Eigenschaft, welche das Blutserum des Meerschweinchens durch die Einspritzung von Lösung der Fraktion I des Normal-Rinderserums erst erlangte, da, wie aus Tabelle VIII hervorgeht, dem Normal-Meerschweinchenserum eine solche labende Wirkung auf Kuhmilch nicht zukommt.

Auch dem Normal-Kaninchenserum (vgl. Tabelle II) kommt eine solche Wirkung auf Kuhmilch nicht zu.

Eine Übersicht über die Versuchsresultate giebt Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

	Fraktion I: Rinderserum 0,5 ccm	Fraktion II: Rinderserum 0,5 ccm	Rinderserum 0,5 ccm	Kuhmilch 4 Tropfen
Immunserum nach Einspritzung der Fraktion I, 1 ccm	Trübung	Trübung	leichte Trübung	Niederschlag
Immunserum nach Einspritzung der Fraktion II, 1 ccm	Trübung	Trübung	Trübung	kaum eine Spur Niederschlag
Normales Meerschweinchenserum, 1 ccm	klar	klar	klar	allgemeine Trübung

*) Versuche darüber, ob sich reine Euglobulin- und Pseudoglobulinlösungen ebenso verhalten, sind im Gange.



Zusammenfassung.

Aus meinen Versuchen ergeben sich kurz zusammengefafst folgende Resultate:

1. Durch Wägung der Niederschläge, welche in Rinder- und Kaninchenserum durch Zusatz von Ammonsulfat in steigender Konzentration entstehen, lassen sich 3 kritische Punkte erkennen, welche etwa einer $^1/_3$, $^1/_2$ und totalen Sättigung mit dem Salze entsprechen. Auf diese Weise lassen sich nach dem Vorgange Hofmeisters das Euglobulin, das Pseudoglobulin und das Serumalbumin gesondert gewinnen. Ähnliche Resultate ergeben volumetrische Versuche mit Seris verschiedener Tierspezies (Rind, Kaninchen, Pferd, Meerschweinchen und Schwein).

2. Die präcipitierende Wirkung des Laktoserums vom Kaninchen für Milch, Kaseinlösung und Rinderserum ist an den Euglobulinniederschlag gebunden. Am Normal-Kaninchenserum ist keine Labwirkung auf Milch nachweisbar. Eine solche ist aber an Fraktion I des Normalserums erkenntlich. Der Pseudoglobulinniederschlag des Laktoserums vom Kaninchen enthält keine derartig wirksamen Substanzen.

3. Die hämolytische Wirkung des Rinderblut-Immunserums vom Kaninchen ist an das Euglobulin und an das Pseudoglobulin gebunden, während der Fraktion III, dem Serumalbumin, eine solche Wirkung nicht zukommt.

4. Komplementäre Wirkungen der Fraktionslösungen des Normal-Kaninchenserums sind nicht nachweisbar.

5. Die hämolytische Wirkung des Pseudoglobulins aus Lysinserum des Kaninchens dargestellt, ist ohne weiteres kenntlich. Nicht so verhält es sich mit dieser Wirkung des Euglobulins aus Lysinserum. In dieser Euglobulinfraktion ist eine Substanz vorhanden, welche hemmend auf den Verlauf der Hämolyse wirkt (Antikomplement).

6. Das Antikomplement wird durch Erhitzung auf 56° C. unwirksam.

7. Während die Antikomplementwirkung durch den Zusatz von Ammonsulfat nicht beeinflufst wird, sind die Komplemente des Normalserums sowohl, als auch des Lysinserums gegen dieses Salz sehr empfindlich. Dem entsprechend läfst sich in keiner Fraktion dieser Sera ein Komplement nachweisen.

8. Die Fraktion I (Euglobulin) des Lysinserums zeigt

außer der Lysinwirkung auch eine präcipitierende Wirkung auf Kaseinlösung, Kuhmilch, Rinderserum und Fraktion I des Rinderserums, während Fraktion II des Rinderserums nicht gefällt wird.

9. Nach Immunisierung der Tiere mit Lösungen der Euglobulin- oder Pseudoglobulin-Fraktion zeigte das Immunserum eine deutliche Präcipitinwirkung auf jede der von mir dargestellten Fraktionen.

Graz, 1. Oktober 1902.

Litteratur.

[1]) Fuld und Spiro, Über die labende und labhemmende Wirkung des Blutes. Zeitschr. f. physiol. Chem. 31, 140 u. f.

[2]) Pick, Zur Kenntnis der Immunkörper. Beitr. z. chem. Physiologie und Pathologie 1 (1902).

[3]) Marcus, Über in Wasser lösliches Serumglobulin. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 559 (1899).

[4]) Seng, Über die qualitativen und quantitativen Verhältnisse der Eiweißkörper im Diphtherie-Heilserum. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. 31, 513 u. f.

[5]) Freund und Sternberg, Über Darstellung des Heilkörpers aus dem Diphtherie-Heilserum. Zeitschr. f. Hygiene und Infektionskrankh. 31, 431 u. f. (1899).

[6]) Hamburger, Biologisches über die Eiweißkörper der Kuhmilch und über Säuglingsernährung. Wiener klin. Wochenschr. 49 (1901).

[7]) Bordet, Le mécanisme de l'agglutination. Annal. de l'Inst. Pasteur 1899, p. 240.

[8]) Ehrlich und Morgenroth, Über Hämolyse. V. Mitteilung. Sonderabdruck aus der Berliner klin. Wochenschr. 10, 16 (1901).

[9]) Lipstein, Die Komplementablenkung bei baktericiden Reagenzglasversuchen und ihre Ursache. Zentralbl. f. Bakteriologie und Parasitenkunde 31, 460 u. f. (1902).

[10]) Landsteiner und Calvo, Zur Kenntnis der Reaktion des normalen Pferdeserums. Zentralbl. f. Bakteriologie und Parasitenkunde 31, 781 u. f. (1902).

XXII.

Zur Kenntnis des proteolytischen Enzyms der Hefe.

Von Dr. **Julius Schütz.**

[Aus dem pathologisch-chemischen Laboratorium der k. k. Krankenanstalt „Rudolf-Stiftung" in Wien (Vorstand Dr. E. Freund).]

Bereits in älteren Arbeiten [Schützenberger, Kossel[1]) u. a. war gezeigt worden, dafs in Hefe, welche unter Ausschlufs von Fäulnis sich selbst überlassen wird, ein Abbau von Eiweifskörpern stattfindet. Salkowski[2]) war der erste, welcher zeigte, dafs in gekochter Hefe diese Erscheinung sich nicht nachweisen liefse, und damit die Annahme eines enzymatischen Vorganges nahe legte.

Salkowskis Angaben wurden in neuerer Zeit speziell durch M. Hahn und Geret[3]), sowie durch Kutscher[4]) ergänzt.

Hahn und Geret fanden eine Anzahl sehr bemerkenswerter Thatsachen bezüglich der Wirkungsweise des proteolytischen Enzyms, sowie bezüglich der Natur der Spaltungsprodukte. Sie zeigten insbesondere, dafs das proteolytische Enzym der Hefe in den Prefssaft übergehe und sich daraus bis zu einem gewissen Grade isolieren lasse.

Kutscher fand, dafs sich unter den Spaltungsprodukten aufser dem bereits früher gefundenen Leucin und Tyrosin auch Asparaginsäure, Diaminosäuren, sowie Ammoniak nachweisen lassen.

Ich versuchte nun die Wirkungsweise des Enzyms bezüglich seiner Spaltungskraft gegenüber verschiedenen Eiweifskörpern zu studieren und auch einige quantitative Daten betreffs der Ammoniakbildung zu erhalten. Da ich aus äufseren Gründen gezwungen bin, meine Arbeit für einige Zeit zu unterbrechen, so sehe ich mich veranlafst, einen Teil der ermittelten Thatsachen schon jetzt mitzuteilen.

Bereits Hahn und Geret haben die Einwirkung von Hefepreſssaft auf Eierklar, Kasein, Glutenkasein und Legumin untersucht und gefunden, daſs hierbei das durch Hitze koagulable Eiweiſs durch das im Hefepreſssaft befindliche Enzym vermindert werde. Sie konnten auch eine Verflüssigung fester Karbolgelatine konstatieren.

Ich suchte vor allem der Frage näher zu treten, ob das proteolytische Enzym der Hefe im stande ist, verschiedene Eiweiſskörper in tiefstehende Produkte von nicht mehr albumosen- oder peptonartiger Natur zu spalten, und wie stark diese Spaltungswirkung bei verschiedenen Proteinstoffen ist. Zur Verwendung kamen: Euglobulin, Pseudoglobulin, krystallisiertes Serumalbumin und Gelatine.

Die Eiweiſskörper des Blutserums wurden aus Pferdeblutserum gewonnen, und zwar das Euglobulin durch Drittelsättigung mit Ammonsulfat (es enthielt demnach noch geringe Mengen von Fibrinoglobulin), das Pseudoglobulin durch Halbsättigung des Filtrats vom Euglobulin, das krystallisierte Serumalbumin nach der Methode von Pemsel[5]) (vorsichtiges Behandeln des Serums mit $^{1}/_{5}$-Normalsäure nach Ausfällung der Gesamtglobuline). Letztere Methode lieferte mir stets sehr reine Präparate in sehr guter Ausbeute, besonders nach Einbringung von Impfkrystallen.

Die vier Proteinkörper kamen in möglichst gleichprozentiger wässeriger Lösung zur Verwendung. Die Lösungen gaben sämtlich bei Prüfung mit Nesslerschem Reagens ein negatives Ergebnis, so daſs der Stickstoffgehalt bis auf eventuelle Spuren anderer Substanzen auf Eiweiſs bezogen werden konnte.

Preſshefe wurde mir in sehr groſser Reinheit von der Simmeringer Brauerei in beliebigen Mengen liebenswürdigst zur Verfügung gestellt, wofür ich Herrn Direktor Thausing, sowie Herrn Chemiker Pfeiffer auch an dieser Stelle meinen besten Dank ausspreche.

Die in einem speziell dazu konstruierten Apparate gewaschene Hefe wurde direkt im Gärkeller in sterile Gefäſse gebracht und möglichst bald in Arbeit genommen. Eine bestimmte Quantität wurde in dem Fünffachen des Gewichts an 0,7 proz. Kochsalzlösung aufgeschwemmt und die zum Versuche notwendige Menge mittels Pipette abgemessen. Bei einiger Übung läſst sich auf diese Weise eine genügende Gleichmäſsigkeit erzielen, besonders wenn man die Aufschwemmung während des Aufsaugens mit einem Glasstabe entsprechend umrührt.

Die allgemeine Versuchsanordnung in den folgenden drei Versuchsreihen bestand darin, daſs eine bestimmte Quantität Hefeaufschwemmung (H) von bekanntem Stickstoffgehalt mit der Lösung eines Eiweiſskörpers

vermischt, hierauf mit entsprechenden Mengen konzentrierter Kochsalzlösung und destillierten Wassers auf 100, resp. 101 ccm in der Weise aufgefüllt wurde, dafs schliefslich ein Kochsalzgehalt von 0,7 Proz. resultierte. Als Kontrollprobe diente die gleiche Quantität Hefeaufschwemmung ohne Eiweifszusatz, die unter sonst gleiche Bedingungen gebracht wurde. Die Proben wurden mit Toluol stark versetzt, gut verkorkt und unter häufigem Umschütteln acht Tage im Brutschrank bei 40° belassen.

Nach dieser Zeit wurden sie, wie folgt, verarbeitet.

Nach quantitativem Überspülen in Bechergläser wurden die Proben ganz oder in aliquoten Teilen mit $^1/_8$ bis $^1/_{10}$ verdünnter Essigsäure und hierauf mit 10 proz. Gerbsäure versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand. Hierauf blieben die Flüssigkeiten mindestens 16 Stunden gut zugedeckt stehen; nach dieser Zeit wurde, falls sich die Ausfällung als vollständig erwies, filtriert und im Filtrate der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Sämtliche unten angeführten Zahlen sind das Mittel aus zwei bis drei gut untereinander stimmenden Parallelbestimmungen.

Ich lasse nun meine Versuche tabellarisch folgen:

Tabelle I.

Versuchsreihe	Versuchsnummer	Hefeaufschwemmung ccm	Darin N mg: Im ganzen	Darin N mg: Nicht durch Tannin fällbar	Zugesetzte Proteinlösung: Art derselben	Zugesetzte Proteinlösung: ccm	Darin N mg: Im ganzen	mg: Gesamt-N der Probe	mg: Davon durch Tannin nicht fällbar	Nach achttägiger Digestion bei 40° mg: Nicht durch Tannin fällbar	Nach achttägiger Digestion bei 40° mg: Zunahme durch die Digestion
I.	1	50	225,5	48	0	—	—	225,5	48	207,2	159,2
	2	50	225,5	48	Euglobulin . .	50	240	465,5	48	233,8	185,8
	3	50	225,5	48	Pseudoglobulin	50	240	465,5	48	240,8	192,8
	4	50	225,5	48	Serumalbumin	50	240	465,5	48	238,5	190,5
II.	1	25	109,5	23,6	—	—	—	109,5	23,6	98,7	75,1
	2	25	109,5	23,6	Euglobulin . .	60	288	397,5	23,6	119,0	95,4
	3	25	109,5	23,6	Pseudoglobulin	60	288	397,5	23,6	100,1	76,5
	4	25	109,5	23,6	Serumalbumin	60	288	397,5	23,6	130,0	106,4
III.	1	10	43	10,1	—	—	—	43	10,1	39,0	28,9
	2	10	43	10,1	Pseudoglobulin	60	288	331	10,1	30,0	19,9
	3	10	43	10,1	Gelatinelösung	60	240	283	10,1	130,0	119,9

Wie aus obiger Tabelle ersichtlich, erfolgt während der Digestion in allen Fällen eine Zunahme von durch Tannin nicht fällbarem Stickstoff, jedoch in sehr ungleichem Maſse. Während das Hefeeiweiſs selbst und die Gelatine eine sehr bedeutende Zerlegung unter Bildung von Endprodukten erleiden, ist dieselbe bei Euglobulin und Serumalbumin zwar stets vorhanden, doch viel geringer, beim Pseudoglobulin fehlt sie, wie der Vergleich mit der Kontrollprobe (II, 1 u. III, 1) lehrt, in zwei von drei Fällen ganz.

Ein ganz genauer zahlenmäſsiger Vergleich ist allerdings insofern schwierig, als einmal die Bestimmungen notwendig mit kleinen Messungsfehlern behaftet sind, die sich besonders beim Hefenuklein geltend machen können, sodann, weil nicht sichersteht, ob nicht die Autolyse der Hefe selbst durch den Zusatz der Proteinstoffe eine Veränderung, sei es im Sinne einer Steigerung, sei es einer Verminderung, erfährt.

Ein drittes Bedenken, das man geltend machen könnte, daſs etwa die zugesetzten Proteinstoffe schon an sich ohne Hefezusatz bei der Digestion autolytische Veränderungen durchmachen, ist nicht stichhaltig. Bei den oben angeführten echten Eiweiſslösungen war nach der Digestion nur eine minimale Menge, etwa 2 mg, nicht durch Gerbsäure fällbarer Stickstoff zu erhalten, und auch die Gelatine ergab nur Spuren davon.

Nachstehend gebe ich für die vorstehenden Versuche eine Zusammenstellung der Mengen nicht fällbaren Stickstoffs in Milligramm, welche aus den zugesetzten Proteinstoffen entstanden sind,

sub I unter der Voraussetzung, daſs die Autolyse der Hefe nach Proteinzusatz ebenso verlief wie ohne denselben,

sub II unter der möglichst ungünstigen, gewiſs nicht verwirklichten Voraussetzung, daſs die Hefeautolyse in den mit Protein versetzten Proben so rasch verlief, daſs das gesamte Eiweiſs der Hefe in nicht mehr durch Gerbsäure fällbare Stoffe übergeführt wurde.

Was für viele andere Fermente gilt, daſs sie einem bestimmten Substrat angepaſst sind und an diesem maximale Wirkungen entfalten, während sie sonst ganz ähnliche Stoffe wenig oder gar nicht angreifen, trifft wohl auch für das proteolytische Ferment der Hefe zu. Es erinnert in dieser Beziehung an das Verhalten verwandter autolytischer Fermente, so an das autolytische Ferment der Leber, das nach Jacoby[6]) wohl Albumine, aber nicht Globuline angreift, und an das Erepsin, das nach Cohnheim[10]) viele Eiweiſsstoffe intakt läſst, während es Kasein spaltet.

Tabelle II.

Versuchs-reihe	Versuchs-nummer	Zunahme an nicht durch Gerbsäure fällbarem N in Milligramm	
		nach I	nach II
I	2	+ 26,6	+ 8,3
I	3	+ 33,6	+ 15,9
I	4	+ 31,3	+ 13,0
II	2	+ 20,3	+ 9,5
II	3	+ 1,4	— 9,4
II	4	+ 31,3	+ 20,5
III	2	— 9,0	— 13,0
III	3	+ 91,0	+ 87,0

Die Thatsache, dafs gerade das Hefeeiweifs das günstigste Substrat für die Wirkung des proteolytischen Hefeenzyms darstellt, ist im Sinne der Auffassung, dafs die autolytischen Fermente neben anderen die Aufgabe haben, das abgestorbene Material in eine Form überzuführen, die von der überlebenden Schwesterzelle assimiliert werden kann, gut verständlich.

Die merkwürdige Erscheinung, dafs das Pseudoglobulin so ungleich von dem Hefeenzym angegriffen wurde, ja in einem Fall selbst die Hefeautolyse hemmte, scheint auf die gelegentliche Anwesenheit eines die Proteolyse hemmenden Agens hinzuweisen, was ein Seitenstück zu dem von Fuld und Spiro[3]) beobachteten labhemmenden Agens des Blutserums darstellen könnte. Doch ist die Zahl meiner Beobachtungen zu gering, um daraus mehr denn einen Fingerzeig entnehmen zu können.

Über den Umfang der Ammoniakbildung läfst sich aus folgenden Versuchen einiges entnehmen.

a) 160 g reinster Prefshefe wurden in 800 ccm 0,6 proz. NaCl-Lösung aufgeschwemmt und unter starkem Toluolzusatz 36 Tage lang im Brutschranke belassen. Nach dieser Zeit wird der Gesamt- und der durch Magnesia abspaltbare Stickstoff bestimmt:

Gesamtstickstoff in 100 ccm = 546 mg
Magnesiastickstoff in 100 ccm = 32,4 mg
= 5,91 Proz. des Gesamtstickstoffes.

b) 52 g reinster Prefshefe wurden in 500 ccm 0,6 proz. Kochsalzlösung unter starkem Toluolzusatz 14 Tage lang im Brutschrank belassen. Nach dieser Zeit werden folgende Zahlen erhalten:

Gesamtstickstoff in 100 ccm = 262 mg
Magnesiastickstoff in 100 ccm = 16,6 mg
= 6,29 Proz. des Gesamtstickstoffes.

Zum Vergleiche seien die Zahlen folgender Autoren angeführt. Jacoby[6]) fand in der Leber 5,6 bis 9,4 Proz., Pfaundler[7]) bei der Spaltung von Witte-Pepton durch Bacterium coli etwa 6 Proz., Mochizuki[8]) bei der Trypsinverdauung von krystallisiertem Serumalbumin 5,9 Proz. direkt durch Magnesia abspaltbaren Stickstoff. Es stimmen demnach die Zahlen von Mochizuki, Pfaundler und mir ziemlich überein, während die von Jacoby etwas höher sind, entsprechend der von Jacoby nachgewiesenen Thatsache, daſs das autolytische Leberferment festgebundenen (Monamino- oder Diamino-) Stickstoff in lockergebundenen überführt, während vom Trypsin nichts Ähnliches bekannt und nach Mochizukis Zahlen auch nicht zu erwarten ist. Einen Schluſs darauf, ob das proteolytische Enzym der Hefe mit dem Trypsin identisch ist oder nicht, lassen diese Thatsachen vorläufig ebenso wenig zu wie die bisher in der Litteratur vorliegenden Befunde.

Litteratur.

[1]) Schützenberger, Bulletin de la société chimique u. s. w. 1876; Kossel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 4, citiert bei Kutscher (s. u.).

[2]) Salkowski, Zeitschr. f. klinische Medizin 17, Suppl.

[3]) Hahn und Geret, Zeitschr. f. Biol. 40.

[4]) Kutscher, s. speziell: Sitzungsberichte der Gesellschaft zur Beförderung der gesamten Naturwissenschaften zu Marburg, 20. Juni 1900.

[5]) Pemsel, s. Krieger, Darstellung krystallinischer tierischer Eiweiſsstoffe. Inauguraldissertation, Straſsburg 1899.

[6]) Jacoby, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 156 bis 158.

[7]) Pfaundler, Centralbl. f. Bakt. 31 (1902), Nr. 4, S. 118.

[8]) Mochizuki, diese Beiträge 1, 49.

[9]) Fuld und Spiro, Zeitschr. f. physiol. Chem. 31.

[10]) Cohnheim, Zeitschr. f. physiol. Chem. 35.

XXIII.

Über ein neues Produkt der Pankreasselbstverdauung.

Von Dr. **Fritz Baum.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Bei Untersuchung von Verdauungslösungen, wie sie durch Selbstverdauung von Pankreas unter Ausschlufs von Fäulnis erhalten werden, habe ich ein bisher nicht bekanntes Produkt isolieren können, welches darum ein besonderes Interesse beansprucht, weil es mit dem Indolkomplex des Eiweifsmoleküls in näherer Beziehung zu stehen scheint*).

Zur Darstellung verfuhr ich, wie folgt: Rindspankreas wird von anhaftenden anderen Gewebsteilen möglichst befreit, fein zerhackt mit dem doppelten Gewicht Wasser übergossen, mit etwas Natriumkarbonat alkalisch gemacht und nach reichlichem Toluolzusatz der Digestion überlassen. Nach drei Tagen wird das nicht angegriffene Bindegewebe abkoliert, die Verdauungslösung in geschlossenen Flaschen weitere fünf bis sechs Wochen bei 30° stehen gelassen.

Nach dieser Zeit ist die Biuretreaktion verschwunden oder kaum mehr nachweisbar, dagegen können noch geringe Mengen eines beim Erhitzen aus der Lösung sich ausscheidenden eiweifsartigen Körpers vorhanden sein. Die Verdauungslösung wird nunmehr auf dem Wasserbade stark eingeengt, mit viel starkem Alkohol in der Wärme versetzt, wodurch die Fällung weniger schmierig wird, und nach dem klaren Absitzen des entstandenen Niederschlags durch Dekantieren und Absaugen das alkoholische

*) Eine vorläufige Notiz diesen bereits im Jahre 1899 gemachten Befund betreffend findet sich am Schlusse der Arbeit Landolts, „Über das Melanin der Augenhäute“, Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 210.



Filtrat gewonnen. Dasselbe wird nochmals möglichst weit eingeengt und neuerdings mit viel Alkohol gefällt. Das letzte alkoholische Filtrat wird von Alkohol befreit und unter Zusatz von Wasser so lange auf dem Wasserbade erwärmt, bis aller Alkohol vertrieben ist. Sodann wird wieder mit Wasser verdünnt, starke Natronlauge zugesetzt und unter Kühlung mit Benzoylchlorid geschüttelt. Der entstandene Niederschlag wird durch Waschen mit mäfsig starker Natronlauge im Schütteltrichter von schmierigen Bestandteilen befreit und in einen grobkörnigen Zustand übergeführt. Sodann krystallisiert man aus heifsem Alkohol um und wiederholt dies zweimal. Man erhält so farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 169°.

Die Ausbeute an analysenreiner Substanz betrug, wenn ich von 20 Stück Rindspankreas ausging, etwa 3 g.

Die Analyse ergab folgende Werte:

	I	II	III	IV	V	Mittel:
C	75.17	74,50	74,93	—	—	74,87
H	5,74	5,42	5,38	—	—	5,51
N*)	—	—	—	4,41	4,60	4,51
O	—	—	—	—	—	15,11

Diese Zahlen entsprechen der Formel $C_{38}H_{32}N_2O_6$.

Berechnet:		Gefunden:
C	74,47 Proz.	74,87 Proz.
H	5,27 „	5,51 „
N	4,58 „	4,51 „
O	15,68 „	15,11 „

Eine Benzoylbestimmung nach R. und H. Meyer**), so ausgeführt, dafs die durch Verseifen mit Natriumalkoholat erhaltene Benzoesäure der angesäuerten Lösung mit Wasserdampf übergetrieben und unter Verwendung von Rosolsäure titriert wurde, ergab 67,64 Proz. Benzoyl. Die Formel $C_{10}H_{12}N_2O_2(C_7H_5O)_4$ verlangt 68,68 Proz.

Die Substanz ist schwer löslich in Äther, unlöslich in Benzol. Beim Schmelzen mit Kali entwickelt sie starken skatolähnlichen Geruch.

Durch wässerige und alkoholische Natronlauge wird das Benzoylprodukt verseift. Die wässerige Lösung der freien Base fällt durch Phosphorwolframsäure und giebt mit Bromwasser einen gelben Niederschlag.

*) Bestimmt nach Kjeldahl.

**) Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch. 28, 2965.

Leider war es mir aus äufseren Gründen nicht möglich, die Untersuchung weiter zu führen. Soweit die vorgeführten Thatsachen einen Schlufs gestatten, handelt es sich um ein Verdauungsprodukt, das die Zusammensetzung $C_{10}H_{16}N_2O_2$ besitzt und entweder der Indolgruppe selbst angehört oder doch leicht unter Ringschlufs Abkömmlinge derselben liefert. Das Verhalten gegen Brom erinnert an die von Kurajeff*) festgestellte Thatsache, dafs sich unter den mit Brom aus tryptischer Verdauungslösung fällbaren Körpern (Bromproteinochromen) einer findet, der „schwarze Körper“ Kurajeffs, welcher C:N im Verhältnis 10:2 enthält.

Wegen der vermutlichen Beziehung zum Skatol schlägt Herr Prof. Hofmeister vor, das neue Spaltungsprodukt „Skatosin“ zu nennen.

---

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 26, 510.

XXIV.

Weiteres über Skatosin.

Von **Robert E. Swain**, Stanford-Universität, Kalifornien (U. S. A.).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Vor mehr denn drei Jahren hat F. Baum*) aus durch Selbstverdauung gelöstem Pankreas mittels Benzoylierung eine bei 169° schmelzende Verbindung isoliert, welche bei der Kalischmelze indol- oder skatolähnlichen Geruch entwickelte. Auf Grund der Analyse und der Benzoylbestimmung fafste Baum die Verbindung als das Tetrabenzoat einer noch unbekannten basischen Verbindung, des Skatosins ($C_{10}H_{16}N_2O_2$), auf. Die von ihm aus äufseren Gründen abgebrochene Untersuchung wurde im hiesigen Institute weitergeführt. Doch wollte es lange nicht glücken, der Schwierigkeiten, welche sich der Darstellung des interessanten Körpers entgegenstellten, Herr zu werden. Namentlich war zuerst der Umstand, dafs das bei Pankreasselbstverdauung auftretende Oxyphenyläthylamin **) ein Benzoylprodukt liefert, das den gleichen Schmelzpunkt aufweist wie das Tetrabenzoylskatosin, seiner Wiederauffindung hinderlich.

Hingegen gelang es L. Langstein ***), bei sehr weit fortgeschrittener peptischer Verdauung von Bluteiweifs durch Fällung der Verdauungslösung mit Quecksilberchlorid eine durch Phosphorwolframsäure fällbare, durch Pikrinsäure und Jodquecksilberkalium nicht fällbare Base zu erhalten, welche von den Eiweifsreaktionen nur die Xanthoproteinfärbung gab, bei der Kalischmelze reichlich Skatol entwickelte und ein in Nadeln krystallisierendes Benzoyl-

*) Vgl. Landolt, Über das Melanin der Augenhäute. Anm. Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 210.

**) R. L. Emerson, diese Beiträge 1, 501.

***) L. Langstein, daselbst 1, 518.

produkt gab, das bei 169 bis 170° schmolz. Die freie Base, in möglichst konzentrierter Lösung mit Alkohol gefällt, schied sich beim Erkalten in glitzernden spiefsförmigen Nadeln ab. Auch ein krystallinisches Platinsalz war darstellbar. Doch genügte die erhaltene Menge nicht zur Analyse. Langstein weist darauf hin, dafs dieses Verdauungsprodukt vielleicht mit Baums Skatosin identisch ist. Wenn diese Vermutung zutrifft, so wäre damit erwiesen, dafs das Skatosin nicht aus einem blofs dem Pankreas angehörigen Stoffe herstammt, vielmehr wahrscheinlich ein weiter verbreitetes Spaltungsprodukt der Eiweifskörper darstellt*).

Unter Benutzung der im hiesigen Laboratorium inzwischen bei der Verarbeitung von Verdauungsgemengen gemachten Erfahrungen, namentlich jener von R. L. Emerson, vermochte ich bei Wiederaufnahme der Versuche Baums einen zuverlässigen Weg zu seiner Isolierung zu finden und die vorläufig aufgestellte Formel durch Darstellung des Hydrochlorats zu stützen.

70 Pankreas vom Rind werden von Fett und fremdem Gewebe thunlichst befreit, mit 35 Litern Wasser übergossen und nach reichlichem Toluolzusatz 10 bis 11 Tage im Brutofen bei 35 bis 38° der Selbstverdauung überlassen. Dann wurde die keine Spur von Fäulnis zeigende Flüssigkeit von den unverdauten Resten durch Kolieren getrennt, durch Erhitzen und Ansäuern von koagulablem Eiweifs befreit, mit etwas Baryumkarbonat zur Abstumpfung der sauren Reaktion versetzt und bis zum Beginn der Tyrosinausscheidung eingeengt. Nach dem Erkalten bildete sich eine reichliche Ausscheidung, welche abfiltriert wurde. Sowohl der noch reichlich Mutterlauge zurückhaltende Filterrückstand wie das Filtrat wurden nun mit so viel 95 proz. Alkohol angerührt, dafs die Konzentration an Alkohol etwa 75 bis 80 Proz. entsprach, und die Masse neuerdings filtriert. Die alkoholische Lösung wurde wieder zum Sirup eingedampft und dieser mit 95 proz. Alkohol unter Schütteln erschöpft, bis der Alkohol nur noch schwache Färbung annahm**). Das alkoholische Extrakt wurde dann zum Sirup eingeengt und dieser mit 1 Liter Aceton gut durchgeschüttelt. Dann schied sich, wie bereits Langstein und Glaessner***) beobachtet haben, eine

*) Das inzwischen von Hopkins und Cole (Journ. of physiol. 27, 418) aus Pankreasverdauungslösungen erhaltene Tryptophan, $C_{11}H_{12}N_2O_2$, welches sicher ein Skatolderivat ist, scheint nach Eigenschaften und Zusammensetzung (vgl. namentlich den viel niedrigeren Wasserstoffgehalt) nicht in unmittelbarer Beziehung zum Skatosin zu stehen.

**) Der in Alkohol unlösliche Teil enthielt neben anorganischen Salzen, Tyrosin und anderen Stoffen nicht unerhebliche Mengen Cystin, das ja bekanntlich als Spaltungsprodukt des Eiweifses zuerst bei Trypsinverdauung beobachtet wurde (Külz). Die Schwefelbestimmung ergab 26,56 Proz. S. (Berechnet: 26,62 Proz.)

***) Diese Beiträge 1, 39.

überstehende rötlichbraune, klare, acetonreiche Flüssigkeit, und ein acetonarmer, schwarzer, am Boden sich absetzender Sirup ab. Daneben entstand ein gelbgrauer leichter Niederschlag, der sich zumeist über dem schwarzen Sirup in der Acetonlösung locker absetzte. Der bodenständige Sirup und der Niederschlag wurden von dem acetonlöslichen Anteile getrennt, im Wasserbad zur Trockne gebracht, in wenig Wasser gelöst und zunächst in Schacherls Extraktionsapparat mit Amylalkohol erschöpft, was etwa eine Woche in Anspruch nahm. Der in Amylalkohol unlösliche Rückstand wurde in wässeriger Lösung mit Quecksilberacetat gefällt, wobei sich ein sehr schwerer Niederschlag abschied, welcher abfiltriert, ausgewaschen, dann in Wasser verteilt und mit Schwefelwasserstoff zerlegt wurde. Da die erhaltene rotbraune Lösung bei Vorversuchen die Tryptophanreaktion mit Bromwasser und eine schöne Reaktion nach Adamkiewicz gab, wurde behufs Entfernung des Tryptophans nach Hopkins und Cole die gesamte Lösung auf etwa 2 Liter gebracht, mit Schwefelsäure bis zu einem Gehalt von 5 Proz. versetzt und nun mit Merkurisulfat gefällt. Der schwere flockige Quecksilberniederschlag wurde mit Wasser gewaschen, bis das Waschwasser keine Millonsche Reaktion gab, dann das Filtrat mit den Waschwässern vereinigt, heifs mit Schwefelwasserstoff von Quecksilber, dann das Filtrat vom Quecksilbersulfid, mit Baryumkarbonat von Schwefelsäure befreit, auf ein Volum von 500 ccm eingeengt, mit Natronlauge versetzt und anhaltend mit reinem Benzoylchlorid geschüttelt. Es entstand ein dunkler amorpher Niederschlag, welcher abfiltriert, sorgfältig gewaschen und mit Alkohol aufgenommen wurde. Bei langsamem Verdunsten bildete sich ein erheblicher krystallinischer Niederschlag. Er wurde einigemal aus heifsem Alkohol umkrystallisiert und schliefslich in reinweifsen Krystallen vom Schmelzpunkt 169° erhalten, welche bei der Kalischmelze Skatolgeruch entwickelten.

	Die Analyse ergab:	Berechnet für Tetrabenzoylskatosin $C_{10}H_{12}N_2O_2(C_7H_5O)_4$:
C	74,22 Proz.	74,47 Proz.
H	5,28 „	5,27 „
N*)	4,49 „	4,58 „
O	16,01 „	15,68 „

Hydrochlorat. Etwa 2,5 g der Substanz wurden mit Salzsäure durch sechsstündiges Erhitzen auf dem Wasserbade gespalten. Die leicht gelb gefärbte Lösung setzte beim Erkalten Benzoesäure ab. Zur Entfernung der überschüssigen Salzsäure wurde mehrere Tage mit strömendem Wasserdampf destilliert, der Rückstand auf ein ganz geringes Volum (3 ccm) gebracht. Beim Abkühlen bildete sich eine reichliche aus schiefwinkeligen Plättchen bestehende Ausscheidung, die mit verdünntem Alkohol gewaschen wurde.

Die Substanz war gelblichweifs, enthielt kein Krystallwasser und schmolz unter Schwärzung und Gasentwickelung bei 345 bis 355°.

*) Bestimmt nach Dumas.

Die Analyse ergab:	Berechnet nach $C_{10}H_{16}N_2O_2 . 3HCl$:
C = 39,23 Proz.	39,27 Proz.
H = 6,29 „	6,27 „
N*) = 9,31 „	9,19 „
Cl = 34,77 „	34,80 „
O = 10,40 „	10,47 „

Danach steht die Formel des Skatosins mit $C_{10}H_{16}N_2O_2$ aufser Zweifel. Nach dem Verhalten zu Benzoylchlorid darf angenommen werden, dafs es zwei NH_2- und zwei OH-Gruppen enthält. Nach dem hohen Wasserstoffgehalt zu schliefsen, enthält es den Indolkern nicht als solchen. Vielmehr ist zu vermuten, dafs die Bildung von Skatol (oder einem ähnlichen Körper) bei der Kalischmelze ein sekundärer Vorgang ist. Sehr auffällig und der Aufklärung bedürftig ist der Chlorgehalt des Hydrochlorats, da man im Skatosin nach seinem Stickstoffgehalt eine zweiwertige Base vermuten mufste.

Die im hiesigen Laboratorium weitergeführte Untersuchung soll über diese und ähnliche Fragen, sowie über die physiologischen Beziehungen der neuen Base Aufschlufs bringen.

*) Bestimmt nach Dumas.

XXV.

Zur Frage der spezifischen Wirkung der intracellulären Fermente.

Von Dr. **Martin Jacoby**,

Privatdozent und Assistent am pharmakologischen Institut.

(Aus dem pharmakologischen Institut zu Heidelberg.)

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben ergeben, dafs aufser den von Salkowski entdeckten eiweifsspaltenden Fermenten der Leber und der Muskeln sich ähnliche Fermente auch in zahlreichen anderen Organen finden. Bisher ist nichts darüber bekannt, ob diese Fermente in dem Sinne spezifisch sind, dafs sie die Eiweifskörper der anderen Organe nicht spalten können. Diese Frage bildet den Gegenstand vorliegender Arbeit.

Methode.

Der Plan der Versuchsanordnung ging dahin, festzustellen, ob Lebersaft die Spaltung der stickstoffhaltigen Substanzen des Lungengewebes zu beeinflussen vermag. In einer Versuchsreihe wurde festgestellt, wieviel nicht aussalzbare Produkte gebildet wurden, in einer zweiten wurde die Quantität des nicht koagulablen Stickstoffs bestimmt.

Für die einzelnen Versuche wurden immer ein oder zwei Hunde durch Verbluten getötet, die Organe sofort zerhackt. Der Leberbrei wurde mit destilliertem Wasser oder 0,9 proz. Kochsalzlösung unter Toluolzusatz so versetzt, dafs auf 100 g Leber 100 ccm Flüssigkeit genommen wurden. Dann wurde durchgerührt und nach kurzer Zeit filtriert. Man erhält so einen dünnen Lebersaft, der neben anderen Substanzen Eiweifskörper und Fermente, darunter auch das Lebereiweifs spaltende Ferment enthält.

Vom Lungenbrei wurden Portionen (in den einzelnen Versuchen von 10 bis 100 g schwankend) abgewogen. Zu jeder Portion wurde

die gleiche Menge Kochsalzlösung und Toluol zugefügt, bei einem Teil der Proben wurden einige Kubikzentimeter der Kochsalzlösung (in den einzelnen Versuchen schwankte das zwischen 10 und 25 ccm) durch Lebersaft ersetzt.

Von dem Lebersaft wurde aufserdem eine Reihe entsprechender Proben besonders abgemessen.

Alles kam dann auf 24 — 48 Stunden in den Brutschrank bei 37°. Dann wurden die Proben ohne Lebersaft mit den besonders digerierten Lebersaftproben vereinigt, einige Lebersaftproben auch besonders verarbeitet.

In einem Teil der Versuche wurde nun mit Hülfe von gesättigter Lösung von stickstofffreiem Zinksulfat und Zufügung des Salzes in Substanz Sättigung mit Zinksulfat hergestellt, dann so viel stickstofffreie Schwefelsäure zugesetzt, dafs die Konzentration etwa 0,4 Proz. betrug. Nach einigen Stunden wurde filtriert; die Niederschläge wurden mit gesättigter Zinksulfatlösung, der Schwefelsäure zugefügt war, ausgewaschen und grofse Anteile der gemessenen Filtrate auf einmal zur Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwandt. Vertreibt man das Wasser auf dem Wasserbade und Sandbade und zersetzt in Jenenser Kolben, so macht der grofse Salzgehalt keine Schwierigkeiten.

Bei den Koagulationsversuchen wurden besonders gute Resultate erzielt, wenn die saure Reaktion nach dem von J. Schütz*) angewandten Verfahren durch Mononatriumphosphat hergestellt wurde.

Resultate.

Die Resultate der beiden Versuchsreihen fielen in jeder Gruppe immer gleichartig aus — auch in mehreren in der Tabelle nicht aufgeführten Versuchen. Hier habe ich die Versuche wiedergegeben, bei denen die Kontrollproben am zahlreichsten sind und besonders gut übereinstimmen.

Lungenmenge pro Portion	Lungenbrei und Lebersaft		Differenz	
	Nach der Autolyse vereinigt	Vor der Autolyse vereinigt		
20 g	0,255 g	0,289 g	+ 34 mg	Aussalzung
50 „	0,584 „	0,658 „	+ 74 „	
10 „	0,069 „	0,113 „	+ 44 „	
10 „	0,071 „	0,073 „	+ 2 „	Koagulation
15 „	0,104 „	0,103 „	— 1 „	

Zusatz von Lebersaft vermehrt also nicht den nicht koagulablen Stickstoff bei der Spaltung des Lungengewebes, wohl aber den

*) J. Schütz, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 5.

nicht aussalzbaren Stickstoff. Es wird also infolge Einwirkung des Lebersaftes nicht mehr Eiweifs gespalten, wohl aber die Quantität der niederen Spaltungsprodukte vermehrt, also mehr Albumose weiter gespalten als in der normalen Lungenautolyse.

Nun habe ich früher*) in Übereinstimmung mit Salkowskis Beobachtungen bei der Leberautolyse Albumosen nur in Spuren gefunden. Ehe man also den analytischen Werten Gewicht beilegen konnte, war besonders festzustellen, ob bei der Lungenautolyse im Gegensatz zu dem Verhalten bei der Leberverdauung in der That viel Albumosen auftreten. Das war schon deshalb wahrscheinlich, weil F. Müller**) bei der Autolyse der pneumonischen Menschenlunge Deuteroalbumosen nachgewiesen hat. In der That konnte ich mich in besonderen Versuchen von dem Auftreten reichlicher Mengen von Albumosen bei der Autolyse der Hundelunge überzeugen.

Koaguliert man Hundelungenbrei nach 24 stündiger Autolyse in Gegenwart von Mononatriumphosphat, entfernt zur Sicherheit etwa noch vorhandene Eiweifskörper durch $^1/_3$-Sättigung mit Zinksulfat und sättigt das Filtrat mit Zinksulfat in Gegenwart von Schwefelsäure, so erhält man reichliche Niederschläge, deren Lösung schon in kleinsten Proben intensive Biuretreaktion geben. — Läfst man auf Lungenalbumosen, die man durch Koagulation der Eiweifskörper fermentfrei erhalten hat, Lebersaft einwirken, so nehmen in 36 stündiger Verdauung zwar die Albumosen stark ab, verschwinden aber keineswegs vollständig.

Leber- und Lungenautolyse unterscheiden sich also zunächst dadurch, dafs bei der Lungenautolyse jedenfalls quantitativ weit mehr Albumosen nachweisbar sind als bei der Leberautolyse. Die fermentative Eiweifsspaltung in beiden Organen erweist sich insofern als spezifisch, als das Leberferment die Lungeneiweifskörper nicht zu spalten vermag***). Das ist nicht befremdend, da die verschiedenen Organe nicht völlig übereinstimmende Eiweifssubstanzen besitzen und viele Fermente nur auf ganz bestimmte chemische Strukturen eingestellt sind. Auch mit physiologischen Vorstellungen harmo-

*) Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 1900.

**) Verhandl. d. naturforsch. Gesellsch. in Basel 1901 und Verhandl. d. Kongr. f. innere Medizin 1902.

***) Eine noch experimentell zu prüfende Möglichkeit bestände darin, dafs beide Fermente zwar in ihrer Fermentwirkung gleich sind, aber verschiedene Antikörper besitzen und in der Lunge ein Antihepatolysin vorhanden ist. Denn durch Morgenroth ist festgestellt, dafs zwei Labfermente verschiedener Herkunft auf Milcheiweifs ganz gleich wirken können und doch ganz verschiedene Antikörper besitzen.

nieren unsere Beobachtungen, ganz besonders, wenn man die zur Zeit besser als früher gestützte Annahme synthetischer Funktionen der spaltenden Fermente zuläfst. Denn wir verstehen dann, dafs mit Hülfe der spezifischen Organfermente aus dem Material, welches den Organen zufliefst, die spezifischen Organeiweifskörper aufgebaut werden.

Ferner wird im normalen Stoffwechsel weder Leberferment zur Lunge noch Lungeneiweifs zur Leber gelangen, eine Spaltung des Lungeneiweifses durch Leberferment wäre also ohne leicht ersichtliche physiologische Bedeutung.

Auch die Zunahme der Spaltung der Lungenalbumosen durch Lebersaft hat nichts Befremdendes an sich. Diese Zunahme kann bedingt sein durch Aktivierung von Zymogenen albumosenspaltender Lungenfermente oder durch direkte Leberfermenteinwirkung. Für die zweite Annahme sprechen einige chemische und physiologische Gesichtspunkte. Zunächst weist der Verlauf der Leberautolyse darauf hin, dafs es ein Leberferment giebt, welches intensiv Albumosen spaltet, ein Ferment, das in gewisse Analogie mit Cohnheims Erepsin zu stellen ist, wobei wir es unerörtert lassen können, ob dieses albumosenspaltende Leberferment mit dem, das die Eiweifskörper der Leber spaltet, etwas Gemeinsames hat oder nicht. Ferner ist es wahrscheinlich, dafs Lungenalbumosen zur Leber gelangen können, da Embden und Knoop*) unabhängig von der Darmresorption Albumosen im Blut nachgewiesen haben, wir also vermuten dürfen, dafs Albumosen, die im Stoffwechsel der Organe entstehen, wandern und überall im Organismus verwertet werden können. Die chemische Konstitution der Albumosen, die sich aus den einzelnen Organeiweifskörpern abspalten, ist zwar noch nicht bekannt, wohl aber ist sicher, dafs die einfacheren Bausteine der Eiweifskörper sich mehr untereinander gleichen als die komplizierten Eiweifskörper selbst. Wir können also bei Albumosen, die aus verschiedenen Eiweifskörpern stammen, eher die gleiche chemische Struktur erwarten als bei den Eiweifssubstanzen selbst. Also auch von dieser Seite aus betrachtet, ist es verständlich, dafs Leberfermente auf Lungenalbumosen einwirken.

Neben den spezifischen auf die komplizierten Eiweifssubstanzen der Organe eingestellten autolytischen Prozessen (Vorgängen erster Ordnung) können wir als solche zweiter Ordnung heterolytische Prozesse unterscheiden. In diese Gruppe

*) Diese Beiträge 3, 1902.

würde die von mir beobachtete Einwirkung von Leberferment auf Lungenalbumosen einzureihen sein. Unter Heterolyse wäre dabei die Einwirkung der Fermente eines Organs auf Material, das einem anderen Organ entstammt, zu verstehen. Dafs diese Verhältnisse die Organfermente scharf von den physiologisch ganz anderen Zwecken dienenden Darmfermenten unterscheiden, folgt ohne weiteres. Hier sei aber noch besonders hervorgehoben, dafs keineswegs alle eiweifsspaltenden Organfermente nur autolytisch sein müssen; vielmehr mufs von Fall zu Fall entschieden werden, ob sich Heterolyse nachweisen läfst. Eine namentlich für die Pathologie bemerkenswerte Heterolyse ist wohl die neuerdings von F. Müller*) beobachtete Einwirkung von Leukocyten auf Lungengewebe. Da man zumeist die weifsen Blutkörperchen als Lastträger für Substanzen ansieht, deren Heimat in den verschiedensten Körperbezirken zu suchen ist, so läfst F. Müllers Beobachtung erwarten, dafs noch andere pneumolytische Organfermente, die auf die Eiweifskörper der Lunge direkt einwirken, im Organismus sich finden werden.

Zum Schlufs sei noch kurz darauf hingewiesen, dafs gewisse Analogieen, die sich wohl allmählich auf experimentellem Wege zu bestimmten Beziehungen verdichten könnten, zwischen dem hier wiedergegebenen Verhalten der Organfermente und dem der „Komplemente“ bestehen. Die Komplemente sind normale Bestandteile des Organismus, sie sind in ihrer Wirkungsweise untereinander sehr ähnlich, und doch giebt es eine grofse Zahl streng spezifischer Komplemente neben solchen, die weniger spezifisch sind. Ob im übrigen die Komplemente, wie zuerst Buchner angenommen hat, proteolytische, aus den Organzellen stammende Fermente sind, ist eine sehr komplizierte, noch keineswegs geklärte Frage, die wir hier nicht erörtern können.

*) Kongrefs f. innere Med. 1902.

Heidelberg, Ende November 1902.

XXVI.

Beitrag zur Kenntnis der wirksamen Substanzen des Antistreptokokkenserums.

Von **J. Rodhain,**

Assistent am bakteriologischen Institut in Loewen (Direktor: J. Denys).

Injiziert man Pferden wiederholt Streptokokkenkulturen ins Blut, so erscheinen darin neue Substanzen, die dem Serum des immunisierten Tieres spezifische Eigenschaften in folgenden drei Richtungen verleihen. Erstens besitzt das Antistreptokokkenserum eine Schutzwirkung, indem es bei Präventivinjektion die Tiere für Streptokokkeninfektion unempfindlich zu machen und selbst eine ausgebrochene Infektion günstig zu beeinflussen vermag. Ferner besitzt das Antistreptokokkenserum ein Agglutinationsvermögen für Streptokokkenkulturen. Endlich wirkt das Antistreptokokkenserum zwar nicht direkt baktericid auf die ursprüngliche Streptokokkenkultur, vermag aber deren Entwickelung zu beeinflussen. Werden Streptokokken in Streptokokkenserum geimpft, so ordnen sich die Einzelkokken in bestimmter Weise an, und zwar anders als bei der Agglutination.

Hängen diese neuen Eigenschaften ab von der Entstehung von drei verschiedenen neuen Substanzen oder gehören sie einem einzigen neuen Körper an, der unter dem Einfluſs der Immunisation gebildet worden ist?

Um diese Frage zu entscheiden, wurde untersucht, in welcher Beziehung die neuen Eigenschaften des Serums zu den verschiedenen Eiweiſsgruppen stehen, die sich mit Hülfe der Hofmeisterschen Methode aus dem Serum isolieren lassen. Zu den einschlägigen Untersuchungen diente das hochwertige Serum des hiesigen bakteriologischen Instituts. Die Trennung der Eiweiſsfraktionen geschah mit Ammonsulfat; das durch Halbsättigung erhaltene Gesamt-

globulin wurde nach mehrmaligem Umfällen während 48 Stunden dialysieren gelassen, das ausgeschiedene Euglobulin abzentrifugiert, mit destilliertem Wasser ausgewaschen und in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Auch ein durch neunfache Verdünnung des Serums dargestelltes Globulin wurde in derselben Weise behandelt. Das durch Ganzsättigung aus dem Filtrat vom Gesamtglobulin dargestellte Albumin wurde ebenfalls durch Dialyse gereinigt. Alle diese Prozeduren wurden möglichst beschleunigt, da mir von früheren Versuchen her bekannt war, dafs das Antistreptokokkenserum aufserhalb des Organismus an Wirksamkeit sehr schnell einbüfst. Die Lösungen von Euglobulin, Pseudoglobulin und Albumin wurden auf eine dem normalen Serum entsprechende Konzentration gebracht.

Zu unseren Versuchen diente ein von einem Fall von Angina gezüchteter Streptococcus, dessen Virulenz für Kaninchen sehr hochgradig war; die tödliche Dosis betrug $^1/_{10000}$ ccm der frischen Bouillonkultur.

1. Schutzwirkung.

Zuerst wurde in einer Versuchsreihe die Schutzwirkung der einzelnen Eiweifsfraktionen gegen Streptokokkeninfektion untersucht.

Versuch I (Albumin). Von fünf Kaninchen dient I zur Feststellung der Wirksamkeit des Serums: 1 ccm vermochte ein Kilo Kaninchen gegen die 10 fache tödliche Dosis zu immunisieren. II diente zur Kontrolle der Virulenz meiner Streptokokken, die drei übrigen Tiere erhielten steigende Dosen Albumin; die niedrigste Dose entsprach 1 Promille des Antistreptokokkenserums.

Versuch I.

	Gewicht g	Kulturmenge ccm	Injiziert ccm	Resultat
Kaninchen I	900	0,0009	Serum 0,9	Bleibt am Leben; ohne lokale Reaktion
„ II	1000	0,0001	—	Tot nach 36 Stdn.; ohne lokale Reaktion
„ III	800	0,0008	Albuminlösung 0,8	Tot nach 24 Stdn.; ohne lokale Reaktion
„ IV	800	0,0008	3,2	Tot nach 24 Stdn.; ohne lokale Reaktion
„ V	1200	0,0012	6,0	Tot nach 24 Stdn.; ohne lokale Reaktion

Eine im Verhältnis zum Serum fünffache Albumindosis ist also ohne Einfluſs auf die Infektion geblieben.

Versuch II (Albumin). In diesem Versuch wurden noch gröſsere Albumindosen mit demselben negativen Erfolg gegeben.

	Gewicht g	Kulturmenge ccm	Injiziert ccm	Resultat
Kaninchen I	1000	0,001	Serum 1,0	Bleibt am Leben; keine lokal. Erschein.
„ II	800	0,00008	—	Tot nach 24 Stdn.; keine lokale Reaktion
„ III	720	0,00072	Albuminlösung 7,2	Tot nach 24 Stdn.; ohne lokale Reaktion
„ IV	950	0,00995	11,4 12 Prom.	Tot nach 24 Stdn.; ohne lokale Reaktion

Das Albumin entfaltet also nicht einmal den zwölften Teil der Schutzwirkung des Serums.

Versuch III (Pseudoglobulin).

	Gewicht g	Kulturmenge ccm	Injiziert ccm	Resultat
Kaninchen I	900	0,0009	Serum 0,9	Bleibt am Leben; nichts lokal
„ II	900	0,00009	—	Tot nach 24 Stdn.; ohne lok. Symptome
„ III	700	0,0007	Pseudoglobulinlös. 0,7	Tot; ohne lokale Reaktion
„ IV	650	0,00065	1,95	Erysipel des ganzen Ohres; tot nach zwei Tagen
„ V	700	0,0007	3,5	Erysipel des ganzen Ohres; tot nach zwei Tagen

In diesem Versuche zeigt sich die im Verhältnis zum Serum fünffache Menge an Pseudoglobulin auſser stande, die Infektion zu verhüten; da jedoch die beiden letzten Kaninchen der Infektion etwas länger widerstanden und auch das Auftreten lokaler Reaktion auf erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen die Infektion zu deuten schien, wurde ein neuer Versuch mit gröſseren Pseudoglobulindosen angestellt.

Versuch IV (Pseudoglobulin).

	Gewicht g	Kulturmenge ccm	Injiziert ccm	Resultat
Kaninchen I	725	0,00075	Serum 0,75	Bleibt am Leben; nichts lokal
" II	900	0,0009	—	Tot nach 24 Stdn.; nichts lokal
" III	1200	0,0012	Pseudoglobulinlös. 6,0	Tot nach 24 Stdn.; Erysipel am ganzen Ohr
" IV	1000	0,001	10,0	Tot nach 24 Stdn.; Erysipel am ganzen Ohr

Auch in diesem Versuche hat sich trotz hoher Dosen das Pseudoglobulin unwirksam erwiesen, höchstens eine leichte Steigerung der Widerstandsfähigkeit gegen die Infektion bewirkt.

Dafs an dem Ergebnis der bisher mitgeteilten Versuche nicht die zur Fraktionierung angewandte Methode die Schuld trug, lehren die folgenden positiv verlaufenen Versuche mit Euglobulin.

Versuch V (Euglobulin).

	Gewicht g	Kulturmenge ccm	Injiziert ccm	Resultat
Kaninchen I	850	0,00085	Serum 0,85	Bleibt am Leben; nichts lokal
" II	1000	0,0001	—	Tot nach 24 Stdn.; nichts lokal
" III	650	0,00065	Euglobulinlösung 0,65	Tot nach 48 Stdn.; Erysipel am ganzen Ohr
" IV	800	0,0008	2,4	Bleibt am Leben; nichts lokal
" V	820	0,00082	3,28	Bleibt am Leben; nichts lokal

Die Euglobulinfraktion hat sich also in diesem Versuch als wirksam erwiesen, die genauere Bestimmung ihrer Wirksamkeit geschah in folgendem Versuch.

Versuch VI (Euglobulin).

	Gewicht g	Kulturmenge ccm	Injiziert ccm	Resultat
Kaninchen I	900	0,0009	Serum 0,45	Erysipel des ganzen Ohres am zweiten Tage, tot am dritten
„ II	900	0,0009	0,9	Bleibt am Leben; nichts lokal
„ III	1000	0,0001	—	Tot nach 24 Stdn.
„ IV	1150	0,0011	Euglobulinlösung 0,57	Tot nach zwei Tagen; Erysipel am ganzen Ohr
„ V	900	0,0009	0,9	Bleibt am Leben; nichts lokal
„ VI	850	0,00085	1,7	Bleibt am Leben; nichts lokal

In diesem Versuch zeigt sich kaum ein Unterschied in der Wirksamkeit der Euglobulinfraktion und des Gesamtserums: die mit 1 und 2 Promille Euglobulin immunisierten Tiere bleiben ebenso wie die Kontrolltiere am Leben, während das mit 0,5 Promille Euglobulin behandelte Tier etwas schneller als das Kontrolltier zu Grunde geht. Der Versuch wurde mehrfach mit demselben Ergebnis wiederholt; die Euglobulinfraktion hat dieselbe immunisierende Wirkung wie das Gesamtserum.

Zwar wurde wiederholt eine geringe Differenz in der Wirksamkeit zu ungunsten der Euglobulinfraktion beobachtet, doch glauben wir dies auf Verluste bei der Darstellung zurückführen zu müssen. Diese Erklärung ist sicher zutreffend für das durch Verdünnung dargestellte Globulin, das sich bei wiederholtem Ausfällen immer schlechter absetzte und abzentrifugieren liefs.

Versuch VII (Euglobulin).

	Gewicht g	Kulturmenge ccm	Injiziert ccm	Resultat
Kaninchen I	900	0,009	Serum 0,9	Bleibt am Leben; nichts lokal
„ II	900	0,001	—	Tot nach zwei Tagen; nichts lokal
„ III	900	0,0009	Euglobulinlösung 0,9	Tot nach zwei Tagen; nichts lokal
„ IV	1000	0,001	2,0	Bleibt am Leben; nichts lokal

Als Gesamtresultat dieser Versuche ergiebt sich daher, **dafs die Albumin- und Pseudoglobulinfraktion im Antistreptokokkenserum unwirksam sind, die Schutzwirkung der Euglobulinfraktion allein zukommt** und zwar in einer dem Gesamtserum entsprechenden Stärke.

Wir wissen seit den Arbeiten von Denys und Leclef*), dafs das Heilvermögen des Antistreptokokkenserums darauf beruht, dafs es den Leukocyten die Fähigkeit zur Phagocytose verleiht, wenn sie diese vorher nicht besafsen. Nach dem Vorgang der genannten Autoren läfst sich die Phagocytose sehr gut experimentell in vitro nachweisen. Da nun nach unseren Versuchen dem Euglobulin des Serums das gesamte Immunisierungsvermögen zukommt, so mufste sich auch seine Wirkung auf die Phagocytose nachweisen lassen, wenn die Anschauungen von Denys und Leclef richtig waren. Dies liefs sich in der That durch folgenden Versuch erzielen:

Versuch VIII. 6 Röhrchen wurden mit je 0,9 ccm normalen Kaninchenserums, sowie 0,1 ccm eines durch Injektion von abgetöteten Streptokokken erhaltenen leukocytenreichen Pleuraexsudates beschickt; ins erste Röhrchen kam aufserdem 0,1 ccm normalen Pferdeserums, ins zweite nichts, ins dritte 0,1 ccm Antistreptokokkenserum, ins vierte, fünfte, sechste je 0,1 ccm Euglobulin-, bezw. Pseudoglobulin- und Albuminlösung, die beiden letzteren mit einem entsprechenden Zusatz von Kochsalz. Alle Röhrchen wurden mit einer Öse frischer Streptokokkenkultur geimpft und bei 39° C. im Wasserbad gehalten und öfter umgeschüttelt. (Siehe Tabelle S. 457.)

Wir finden, wie die Tabelle lehrt, in den Kontrollröhrchen 1 und 2 die Phagocytose gleich Null, das Kokkenwachstum sehr lebhaft, in den Röhrchen 5 und 6, die mit Pseudoglobulin und Albumin beschickt sind, ist das Mikrobenwachstum ebenso üppig, Phagocytose fehlt; ferner in Röhrchen 3, das mit Antistreptokokkenserum beschickt ist, findet intensive Phagocytose statt; auf 50 Leukocyten, die ausgezählt werden, findet sich die Hälfte mit Kokken und Ketten vollgefüllt; die Phagocytose ist so energisch, dafs das Mikrobenwachstum stark geschädigt wird und 6 Stunden nach der Impfung sich erst 1 bis 2 lange Ketten im Gesichtsfeld zeigen; endlich, dafs das mit Euglobulin beschickte Röhrchen 4 sich vollkommen ebenso verhält wie Röhrchen 3. **Es hat also nur die Euglobulinfraktion im Antistreptokokkenserum die Fähigkeit, die Leukocyten zur Phagocytose virulenter Streptokokken zu veranlassen.** Das Antistreptokokkenserum

*) La Cellule, 1895.

	Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3	Röhrchen 4	Röhrchen 5	Röhrchen 6
Ins Wasserbad um 2 Uhr 30 Min. eingesetzt	0,9 ccm Normal-Kaninchenserum + 0,1 ccm Pleuraexsudat + 0,1 ccm Normal-Pferdeserum 1 Öse Streptokokken.	0,9 ccm Normal-Kaninchenserum 0,1 ccm Pleuraexsudat — 1 Öse Streptokokken.	0,9 ccm Normal-Kaninchenserum 0,1 ccm Pleuraexsudat 0,1 ccm Antistreptokokkenserum 1 Öse Streptokokken.	0,9 ccm Normal-Kaninchenserum 0,1 ccm Pleuraexsudat 0,1 ccm Euglobulinlösung 1 Öse Streptokokken.	0,9 ccm Normal-Kaninchenserum 0,1 ccm Pleuraexsudat 0,1 ccm Pseudoglobulinlösung 1 Öse Streptokokken.	0,9 ccm Normal-Kaninchenserum 0,1 ccm Pleuraexsudat 0,1 ccm Albuminlösung 1 Öse Streptokokken.
Unmittelbar nachher untersucht	Wenig Kokken und Diplokokken und kurze Ketten im Gesichtsfeld. Weifse Blutkörperchen lebend.	Gleicher Befund.	Gleicher Befund.	Gleicher Befund.	Gleicher Befund.	Gleicher Befund.
1 Stde. später	Ziemlich zahlreiche Kokken, Diplokokken und kurze Ketten im Gesichtsfeld. Phagocytose 0:50.	Ziemlich zahlreiche Kokken, Diplokokken und kurze Ketten im Gesichtsfeld. Phagocytose 0:50.	3 bis 4 Ketten von 10 bis 18 Kokken im Gesichtsfeld. Phagocytose 5:50.	3 bis 4 Ketten von 10 bis 18 Kokken im Gesichtsfeld. Phagocytose 7:50.	Ziemlich zahlreiche Kokken, Diplokokken und Ketten von 3 bis 4 Gliedern im Gesichtsf. Phagocytose 1:50.	Ziemlich zahlreiche Kokken, Diplokokken und kurze Ketten im Gesichtsfeld. Phagocytose 0:50.
3 Stdn. später	Reinkulturen von Kokken und Diplokokken Phagocytose 0:50 Leukocyten am Leben.	Reinkulturen von Kokken und Diplokokken Phagocytose 0:50 Leukocyten am Leben.	Zwei sehr lange Ketten im Gesichtsfeld, die aus 70 Kokken bestehen, keine freien Kokken noch Diplokokken. Starke Phagocytose 28:50 Leukocyten am Leben.	Nur lange Ketten, keine freien Kokken noch Diplokokken. Phagocytose 29:50 Leukocyten lebendig.	Geringes Wachstum von Kokken, Diplokokken und kurzen Ketten. Phagocytose etwa 1:50 (?) Leukocyten lebendig.	Geringes Wachstum von Kokken, Diplokokken und kurzen Ketten. Phagocytose 2:50 Leukocyten lebendig.
Nach 6 Stdn.	Sehr reiche Kultur von Kokken, Diplokokken und kurzen Ketten. Phagocytose 0:50.	Sehr reiche Kultur von Kokken, Diplokokken und kurzen Ketten. Phagocytose 0:50.	1 bis 2 sehr lange Ketten im Gesichtsfeld über die ganze Länge desselben. Sehr ausgesprochene Phagocytose.	Ganz wie 3. Nicht so starke Kettenbildung.	Kultur von Kokken, Diplokokken und kurzen Ketten. Phagocytose 0:50.	Kultur von Kokken, Diplokokken und kurzen Ketten. Phagocytose 0:50.

unterscheidet sich also hierin vom Antidiphtherieserum, dessen Immunisierungsvermögen ganz an die Pseudoglobulinfraktion des Serums gebunden ist*).

2. Agglutinationsvermögen.

Da das Wesen der Agglutination noch unbekannt ist und von einzelnen Forschern als ein die Phagocytose einleitender Vorgang aufgefaſst wird, so schien es uns von Interesse, festzustellen, ob das Agglutinationsvermögen derselben Serumfraktion zukommt, wie das Immunisierungsvermögen.

Versuch IX. Das verwendete Serum agglutinierte die von mir angewandten Streptokokken im Verhältnis 1:50 bis 1:75 (s. nebenstehende Tabelle).

	Zugesetzte Menge	Nach 2 Stdn. im Brutschrank	Nach 4 Stdn.	
Serum	1/10	+	+	Niederschlag
	1/20	+	+	Niederschlag
	1/75	+	+	Niederschlag
	1/100	—	—	
Euglobulin	1/5	+	+	Niederschlag
	1/10	+	+	Niederschlag
	1/20	+	+	Niederschlag
	1/50	+	+	Niederschlag
	1/75	+	+	Niederschlag
	1/100	—	—	
Pseudoglobulin	1/5	—	—	
	1/10	—	—	
	1/20	—	—	
	1/50	—	—	
	1/75	—	—	
	1/100	—	—	
Albumin	1/5	—	—	
	1/10	—	—	
	1/20	—	—	
	1/50	—	—	
	1/75	—	—	
	1/100	—	—	

Die Euglobulinfraktion birgt somit das ganze Agglutinationsvermögen des Antistreptokokkenserums, während Pseudoglobulin und Albumin vollkommen frei davon sind. Ich möchte dabei daran erinnern, daſs beim Pferde das Streptokokkenagglutinin sich in derselben Fraktion findet wie das Choleraagglutinin**).

3. Beeinflussung des Wachstums der Streptokokken.

Unsere Streptokokken, die in Bouillonkultur, ebenso in Kaninchen- und Pferdeserum in Form von Kokken, Diplokokken oder kurzen 4- bis 5gliedrigen Ketten wuchsen, bildeten im Antistreptokokkenserum lange, zum Teil aufgerollte Ketten, die sich zuweilen über das ganze Gesichtsfeld erstreckten und aus mehr als 100 Gliedern bestanden.

An welche Serumfraktion ist dieser Einfluſs gebunden?

*) Ide und Lemaire, Archiv. internat. de pharmacodynamie 6, 1899.

**) E. P. Pick, diese Beiträge 1, 351 (1902).

Hierüber giebt Versuch X Aufschlufs (s. nebenstehende Tabelle).

Wir finden somit, dafs der Streptokokkus sich in Euglobulinlösungen so verhält wie im Antistreptokokkengesamtserum, dagegen von Pseudoglobulin- und Albuminlösungen nicht beeinflufst wird: Demnach ist das Immunisations-, das Agglutinationsvermögen und die Fähigkeit, das Wachstum der Streptokokken zu beeinflussen, gebunden an die Euglobulinfraktion.

Vielleicht handelt es sich also nur um drei verschiedene Eigenschaften einer einzigen Substanz, die im Verlauf der Immunisation im Serum auftritt. Ob es sich dabei um einen Eiweifskörper handelt, vermögen wir vorläufig nicht zu entscheiden, da ja auch andere Substanzen, wie z. B. Fermente, den Eiweifsniederschlägen anhaften können. Pick hat in seiner letzten Arbeit über die Agglutinine versucht, diese von den Eiweifskörpern zu trennen, wie uns scheint, ohne Erfolg. Pröscher*) hat ferner ganz kürzlich angegeben, dafs er das Diphtherieantitoxin vom Pseudoglobulin hat trennen können, seine Methode jedoch noch nicht veröffentlicht. Meine Versuche, die wirksame Substanz des Antistreptokokkenserums vom Euglobulin mit Hülfe von Pepsin zu trennen, waren erfolglos, da die wirksame Substanz durch die Pepsinverdauung vollständig zerstört wird.

Zum Schlufs spreche ich Herrn Professor Denys für die Überlassung des Serums und des Versuchsmaterials meinen herzlichsten Dank aus, ebenso Herrn Professor Ide für seine wertvollen chemischen Ratschläge.

*) Münchener med. Wochenschr. 1902, Nr. 23.

Versuch X.

	Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3	Röhrchen 4	Röhrchen 5
	2 ccm Normal-Pferdeserum. 1 Öse Streptokokken.	2 ccm Antistreptokokkenserum vom Pferd 1 Öse Streptokokken.	2 ccm Euglobulinlösung (enthaltend 0,85 Proz. NaCl) 1 Öse Streptokokken.	2 ccm Pseudoglobulinlösung (enthaltend 0,85 Proz. NaCl) 1 Öse Streptokokken.	2 ccm Albuminlösung (enthaltend 0,85 Proz. NaCl) 1 Öse Streptokokken.
6 Stdn. nach der Impfung	Kultur besteht aus Kokken, Diplokokken und kurzen Ketten.	Zahlreiche sehr grofse, oft gewundene Ketten.	Zahlreiche grofse Ketten.	Kokken, Diplokokken und kurze Ketten.	Kokken, Diplokokken und kurze Ketten.

XXVII.

Der anaerobe Stoffwechsel der höheren Pflanzen und seine Beziehung zur alkoholischen Gärung.

Von **Julius Stoklasa, Joh. Jelínek** und **Eugen Vítek.**

(Aus der pflanzenphysiologischen Versuchsstation der k. k. böhmischen technischen Hochschule in Prag.)

---

1. Vorbemerkungen.

Schon der älteren einschlägigen Litteratur war die Beobachtung Dumonts*) und Döbereiners**) bekannt, dafs Obst, insbesondere Äpfel und Birnen, wenn sie sich eine gewisse Zeit in einer Kohlensäureatmosphäre befunden haben, nachweisbar Alkohol enthalten. Interessant sind diesfalls die Beobachtungen von Bérard***), der im Jahre 1821 fand, dafs unter Kohlensäureatmosphäre gehaltenes Obst Erscheinungen einer Fermentation zeigt.

Im Jahre 1861 schrieb Pasteur †): „La levure de bière se comporte absolument comme une plante ordinaire, et on peut espérer à rencontrer des conditions dans lesquelles certaines plantes inférieures vivraient à l'abri de l'air en présence du sucre, en provoquant alors la fermentation de cette substance à la manière de la levûre de bière.“

Später experimentierte er mit unter Kohlensäureatmosphäre gehaltenen Weintrauben und kam schliefslich zu der Ansicht, dafs

---

*) Dumont, Neues Journal der Pharmacie, Leipzig 1819, 3, 563.

**) Döbereiner, Annalen der Physik, Leipzig 1822, 72, 430.

***) Bérard, Sur la maturation des fruits. Ann. d. chim. et de phys. 1821.

†) Pasteur, Influence de l'oxygène sur le développement de la levure et sur la fermentation alcoolique. Bull. d. la Soc. chim. 1861.

hier ein Prozefs stattfinde, der dem durch Hefe in einem anderen Nährmedium erregten analog ist. — Der Gedankengang Pasteurs gipfelt in den Worten*): „Cette formation de l'alcool est due à ce que la vie chimique et physique de cellules du fruit se continue dans des conditions nouvelles, semblables à celles des cellules des ferments."

Lechartier und Bellamy**) haben die Beobachtungen der früheren Autoren in gröfserem Mafsstabe weiter verfolgt; so gelang es ihnen unter anderem, Kohlensäure und Alkohol als Produkte des anaeroben Stoffwechsels nachzuweisen. Sie experimentierten nicht nur an Birnen, sondern auch an Gersten- und Kastanienfrüchten.

Brefeld***), Müntz†) und Cochin††) setzten die Studien über den anaeroben Stoffwechsel (die „intramolekulare Atmung") an verschiedenen Pflanzenorganen fort und konnten die Resultate der früheren Forscher bestätigen.

Weiter gelangten dagegen Claude Bernard†††), Berthelot†*), Devaux††*), Gerber†††*) und Mazé*†). Sie beobachteten, dafs schon beim Atmen des Pflanzenorganismus in freier Luft die Bildung von Äthylalkohol erfolgt.

Im Jahre 1897 veröffentlichten Em. Godlewski und F. Polzeniusz**†) einen vorläufigen Bericht über die anaerobe Atmung sterilisierter, unter Wasser getauchter Samen und über

---

*) Pasteur, Note sur la production de l'alcool par les fruits. Compt. rend. t. LXXV, p. 1054—1056.

**) Lechartier und Bellamy, Compt. rend. t. LXIX, p. 466, 1869; t. LXXV, p. 1204, 1872; t. LXXIX, p. 1066, 1874.

***) Brefeld, Landw. Jahrb. 5, 327: „Über Gärung." (Brefeld wies Alkohol durch die Jodoformreaktion nach.)

†) Müntz, Ann. de chim. et de phys. V. t. XIII, p. 558.

††) Über die Forschungen Cochins referiert Duclaux in Traité de Microbiologie t. III, 1900.

†††) Claude Bernard, La fermentation alcoolique. Berthelots Bericht in Rev. scientifique 1878.

†*) Berthelot, Travaux de la station Meudon. Paris 1899.

††*) Devaux, Compt. rend. 1899.

†††*) Gerber, Maturation des fruits charnues. Ann. de Sc. Nat. Sér. VIII, t. 4.

*†) Mazé, Signification physiologique de l'alcool dans le règne végétal. Compt. rend. t. 128, p. 1608.

**†) Em. Godlewski und F. Polzeniusz, Über die intramolekulare Atmung von ins Wasser gebrachten Samen und über die dabei stattfindende Alkoholbildung. (Sur la respiration des graines placées dans l'eau et sur la production de l'alcool pendant la respiration. Extrait du „Bulletin de l'Académie de Sciences de Cracovie 1901".)

die Alkoholbildung bei diesem Prozefs. Diesen Versuch wiederholte Mazé*) mit sterilen Samen (Erbsen) in sterilisiertem Wasser, wobei er fand, dafs die so gebildete Alkoholmenge in 27 Tagen 6,56 Proz. der ursprünglichen Erbsentrockensubstanz betrug. Auch Effront**) bewies neuerdings an sterilisiertem Obst die Bildung von Alkohol durch intramolekulare Atmung. Am eingehendsten haben den ganzen Prozefs des anaeroben Stoffwechsels Godlewski und Polzeniusz in ihrer schon erwähnten, erst im vorigen Jahre ausführlich publizierten, an Samen durchgeführten Arbeit klargestellt.

Hier erhalten wir zum ersten Male einen genaueren Einblick in den Chemismus der betreffenden Vorgänge. Es wird festgestellt, dafs Alkohol neben Kohlensäure das Hauptprodukt der intramolekularen Atmung ist, und die Autoren gelangen zu der Schlufsfolgerung, dafs der Reservestoff der Samen, die Stärke, durch Hydrolyse in Glykose übergeht, welche dann so vergärt, wie bei der Alkoholgärung durch Hefe.

Aber nicht nur die Reservestoffe der Samen, sondern auch diesen zugefügte Kohlenhydrate können vom Erbsensamen bei intramolekularer Atmung vergoren werden. Auch die Saccharose z. B. wird invertiert und dann vergoren.

Die Arbeiten von Godlewski und Polzeniusz unterscheiden sich sehr wesentlich von den Experimenten der früher genannten Autoren durch die vorgängige vollkommene Befreiung des untersuchten Objektes von Mikroben. Auch Mazé und Effront experimentierten mit Obst und Samen in mikrobenfreien Medien, aber ihre Arbeiten verfolgten nicht das Ziel, eine vollständige Bilanz des anaeroben Stoffwechsels festzustellen.

Eigene Versuche belehrten uns, dafs manchmal selbst nach sorgfältigster Sterilisierung und bei vorsichtigster Arbeit die Versuchslösungen nach Beendigung der Experimente lebensfähige Bakterienkeime aufwiesen. Überdies wissen wir aus eigener Erfahrung, dafs eine grofse Zahl von Bakterien durch Vergärung von Glukose und Saccharose Kohlensäure und Alkohol bildet. Erwägt man weiter, dafs nicht nur die Schizomyceten, sondern auch die Phycomyceten und Aspergilleen u. s. w. neben Kohlensäure

*) Mazé, Compt. rend. 1899. Über diese Arbeiten referiert auch Duclaux in Traité de Microbiologie t. III im Artikel „Production de l'alcool par de végétaux vivants", p. 52.

**) Effront, Die Diastasen und ihre Rolle in der Praxis. I. Band. Wien 1900.

Alkohol als Gärungsprodukte erzeugen, so sieht man, wie nötig es ist, bei ähnlichen Experimenten eine ganz besondere Vorsicht walten zu lassen.

Besonders sind dies die ziemlich verbreiteten Mucoraceen (Mucor racemosus, spinosus, mucedo, Rouxii), Aspergilleen (Aspergillus glaucus, oryzae, niger), Penicillium glaucum, weiter Torulaarten, Monilia candida u. s. w., welche unter Umständen Alkoholgärung verursachen. Wehmer*) hat auch thatsächlich viele der angeführten Arten von Mikroorganismen auf Obst gefunden.

2. Versuchsmethodik.

Zu unseren Versuchen wurden Zuckerrüben (Beta vulgaris), Kartoffeln (Solanum tuberosum) und schliefslich Citronenfrüchte verwendet.

Die Untersuchung des anaeroben Stoffwechsels läfst sich besonders gut an der Zuckerrübe ausführen; deshalb wurde Versuchen an derselben besondere Aufmerksamkeit zugewendet. Mitbestimmend war auch der Umstand, dafs hier eine Gesamtbilanz des Stoffwechsels durch Analyse der Versuchsobjekte vor und nach dem Experimente bisher nicht durchgeführt worden ist.

Über den Zusammenhang der normalen mit der intramolekularen (anaeroben) Atmung werden wir noch Gelegenheit haben, zu sprechen; übrigens ist es wahrscheinlich, dafs dieselben in genetischem Zusammenhange stehen, wie dies auch den Ansichten von Pfeffer, Jentys u. a. entspricht.

Die Experimente mit Zuckerrübe haben den praktisch interessanten Hintergrund, dafs, wie bekannt, die Rübe eingemietet wird und dabei namhafte Verluste an Zucker erleidet. Es wurde auch wirklich gefunden, dafs, wenn die die Rübe umgebende Luft in den Mieten nicht mehr als 7 Proz. Sauerstoff enthält, namentlich bei feuchter Witterung intramolekulare (anaerobe) Atmung eintreten kann.

Bei den Versuchen kamen ursprünglich unverletzte Zuckerrübenwurzeln in Verwendung; nur die Blattstiele waren dicht beim Kopf der Rübe abgeschnitten. Die Sterilisation wurde mit 0,1 proz. bis 0,5 proz. Sublimatlösung in der Dauer von 20 Minuten durchgeführt. Es stellte sich jedoch heraus, dafs die danach durch sechs bis sieben Tage unter sterilisiertem Wasser gehaltene Wurzel manchmal doch noch lebensfähige Keime enthielt.

Im ersten Teil der Versuche wurde die Rübe nicht unter sterili-

*) Wehmer, Beiträge zur Kenntnis einheimischer Pilze, Jena 1895.

siertem Wasser gehalten. Im zweiten Teile der Versuche, wo aufser Kohlendioxyd auch Alkohol bestimmt werden sollte und eine peridermlose Wurzel benutzt wurde, führten wir die Sterilisation gründlicher durch, und zwar mit 0,5 prozentiger Sublimatlösung, die wir 25 bis 35 Minuten einwirken liefsen.

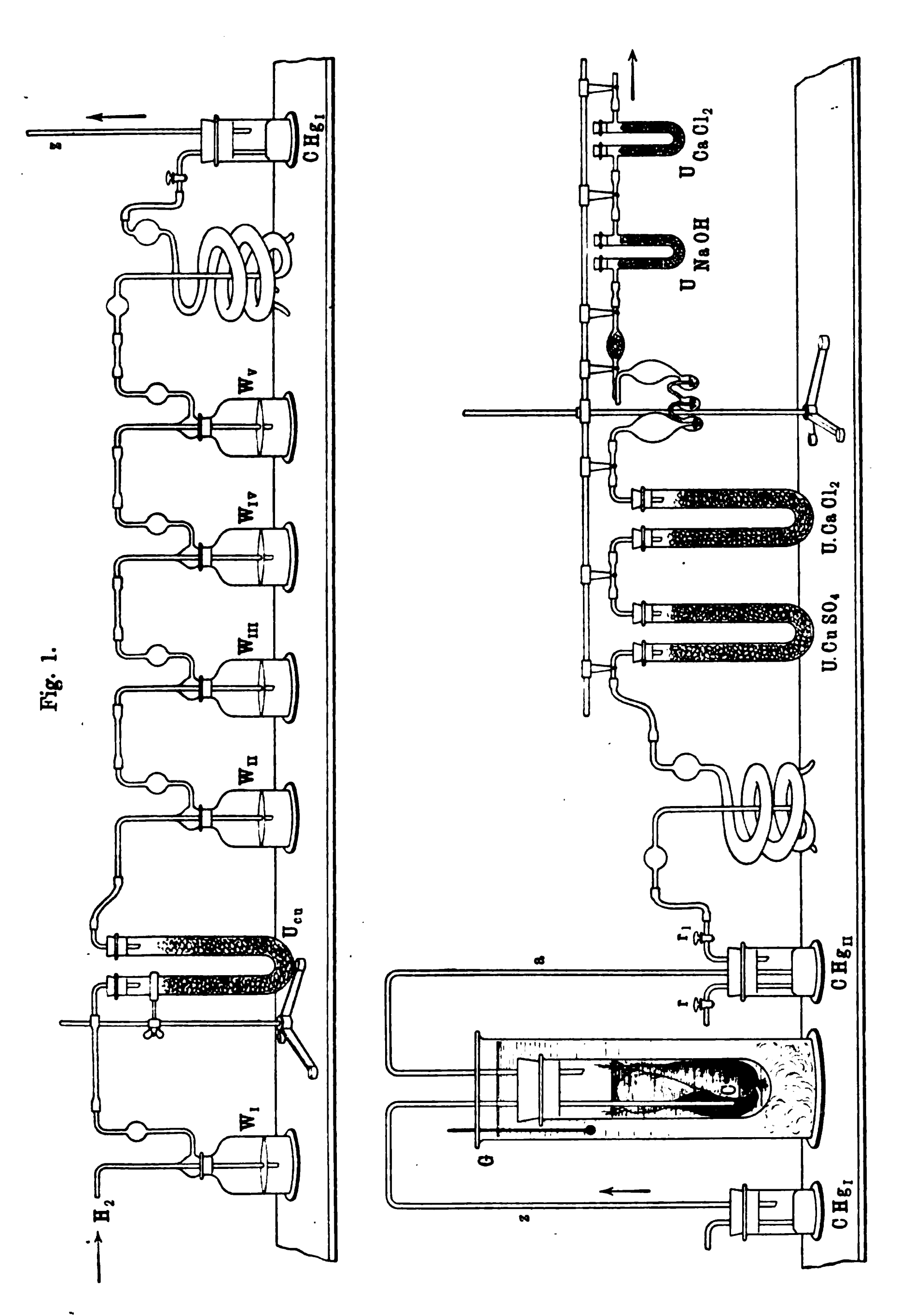
a) Die Anordnung der Apparate.

(Vergl. Fig. 1.)

Der aus dem Kippschen Apparate entströmende Wasserstoff passierte die mit destilliertem Wasser beschickte Waschflasche (W_I), dann die Röhre (U_{Cu}), welche Kupferoxyd enthielt, sodann zwei mit konzentrierter Natriumhydroxydlösung gefüllte Drechselsche Waschflaschen (W_{II}) und (W_{III}), weiter eine ebensolche vierte (W_{IV}), welche eine alkalische Lösung von Pyrogallussäure (5 g Pyrogallussäure in 15 ccm Wasser und 120 g KOH in 80 ccm Wasser) enthielt, und schliefslich eine fünfte (W_V), welche mit 0,5 prozentiger Sublimatlösung beschickt war.

Den 40 cm hohen Cylinder C von 7 cm Durchmesser schliefst ein gut dichtender Kautschukpfropfen, der 4 cm tief in den Cylinder hineinragt. Durch den zweimal gebohrten Pfropfen führen zwei Glasröhren, von denen die zuleitende bis zum Boden des Cylinders reicht, während die ableitende den unteren Rand des Pfropfens um 5 cm überragt. Sie stellen (wie aus Fig. 1 ersichtlich) die Verbindung mit zwei kleineren, 11 cm hohen Cylindern von 5 cm Durchmesser her, die eine 4 cm mächtige Quecksilberschicht enthalten (CHg_I und CHg_{II}). In jenen kleinen Cylinder, in den die Ableitungsröhre a führt, mündet eine knieartig gebogene, mit einem Ablafshahn versehene Röhre r, die in das Quecksilber eintaucht. Die in Quecksilber tauchenden, sowie die mit den Waschflaschen verbundenen Röhrenteile sind mit sterilisierter Baumwolle gefüllt. Dasselbe gilt von der in die kleinen Cylinder hineinragenden Mündung des Zuleitungs- und Ableitungsrohres z und a. Das Ableitungsrohr reicht bis in das Quecksilber des zweiten, kleineren Cylinders und ist ebenfalls mit sterilisierter Baumwolle gefüllt.

Aufser dem Rohre a münden, wie schon erwähnt, noch zwei andere, knieartig gebogene, mit Hähnen versehene Röhren r und r_1 in diesen Cylinder; die eine verbindet ihn mit den Absorptionsapparaten, während die andere zum Heraustreiben des eventuell noch zurückgebliebenen Kohlendioxyds dient. Die Gase passieren nach dem Austritt aus dem Cylinder CHg_{II} zuerst einen Winklerschen Absorptionsapparat, der mit konzentrierter Schwefelsäure gefüllt ist, dann ein 25 cm hohes, 2,5 cm weites U-Rohr mit Kupfervitriolbimsstein, ferner ein zweites U-förmiges Rohr, welches Chlorcalcium enthält, das häufig erneuert wird. Das völlig getrocknete Kohlendioxyd wird von Kaliumhydroxyd (Lösung 2:3) im Geisslerschen Apparate absorbiert. Um die aus diesem entweichende, ganz unbedeutende Menge Wasser aufzufangen, sind weiter mit festem Kaliumhydroxyd und Calciumchlorid gefüllte U-Rohre (U_{NaOH}) vorgelegt. Weiter rückwärts befinden sich noch zwei U-förmige Schutzrohre, dazu bestimmt, in der Luft enthaltenes



H2
W I
U Cu
W II
W III
W IV
W V
CHg I
z
G
C
CHg I
z
CHg II
r
r1
a
U. Cu SO4
U. Ca Cl2
U Na OH
U Ca Cl2

Fig. 1.

Kohlendioxyd (und Feuchtigkeit) abzuhalten. Sie sind mit Calciumchlorid und Kaliumhydroxyd gefüllt und mit dem Aspirator verbunden. Die beiden Röhren U_{NaOH} und U_{CaCl_2} wurden vor und nach dem Durchleiten gewogen.

Der ganze Cylinder (*C*) samt dem Propfen, sowie auch einem Teile der Röhren tauchen in einen gröfseren, 0,5 prozentige Sublimatlösung enthaltenden Glascylinder *G* von 52 cm Höhe und 11 cm im Durchmesser. Die Cylinder samt Stopfen und zugehörigen Röhren werden sterilisiert.

b) Versuchsanordnung.

Die Versuche, betreffend die normale Atmung, wurden nach bekannter Methode angeordnet. Um die ausgeschiedene Kohlendioxydmenge festzustellen, wurde durch den Apparat Luft getrieben, die vorher absolut von Kohlendioxyd befreit worden war.

Um die Menge des bei intramolekularer (anaerober) Atmung in einem Wasserstoffstrome ausgeatmeten Kohlendioxyds bei verschiedener Temperatur bestimmen zu können, wurden die Rüben nach einer Sterilisierung mit 0,2 bis 0,5 prozentiger Sublimatlösung in der Dauer von 25 Minuten in den Cylinder gebracht.

Beim Studium der Bildung von Alkohol neben jener des Kohlendioxyds wurde wieder ein anderer Modus gewählt. Die ganze Wurzel (auch wenn sie auf der Oberfläche des Periderms sehr sorgfältig gereinigt worden war) zu sterilisieren, hielt sehr schwer, weshalb das Periderm und eine weitere 1,15 cm dicke Schicht der eigentlichen Zuckerrübenwurzel (des sogen. „Fleisches“) entfernt wurde. Erst dann wurde die Rübe durch 25 Minuten in 0,5 proz. Sublimatlösung sterilisiert; die zurückgebliebene Sublimatlösung wusch man mit sterilisiertem Wasser ab.

Es wurde nun weiter folgendes Verfahren eingehalten: Die vorsichtig gereinigte, vom Periderm befreite Wurzel wurde in zwei Hälften geteilt, von diesen jede abgewogen und bezeichnet. Nach wiederholter Sterilisierung mit 0,5 proz. Sublimatlösung in der Dauer von 25 Minuten wurden beide Stücke in sterilisiertem Wasser gewaschen. Hierauf wurde die eine Hälfte abgesengt und in den Cylinder gebracht, die andere gewogen und analysiert. Diese Procedur wiederholte man mit so viel Rüben, als zur Erzielung des nötigen Gewichtes gebraucht wurden.

Die Wurzeln wurden in steriles, destilliertes, durch Kochen von Luft befreites Wasser getaucht.

So war es möglich, eine thunlichst genaue Voranalyse durchzuführen. Nachdem dann der Cylinder noch abgesengt worden war, verschlofs man ihn und machte den Pfropfen durch Übergiefsen mit geschmolzenem Paraffin völlig undurchlässig.

c) Analytische Methoden.

Der Zucker wurde vor und nach dem Versuche aus der Rübe mittels Alkohol im Soxhletschen Apparate extrahiert und nach bekannter Methode bestimmt. Der Invertzucker wurde nach

Pavy*) bezw. Peska**) ermittelt. Diese Methode liefert viel niedrigere Zahlen, als diejenigen, welche man nach der Methode von Herzfeld erhält. Wir hielten uns im ganzen an die Art der Durchführung, welche Karl Andrlík in seiner einschlägigen Arbeit***) angedeutet hat.

Die Trockensubstanz wurde an 15 bis 20 g des Breies, welcher mit einer kleinen Menge von Methylalkohol bespritzt wurde, bestimmt. Zuerst wurde dieser Brei bei 60 bis 70° C., dann bei 98 bis 100° C. getrocknet, bis der Verlust zwischen den einzelnen Wägungen 3 bis 5 mg betrug.

Der Alkohol wurde in der Zuckerrübenwurzel (im Brei) vor und nach dem Versuche bestimmt.

Der abgewogene Rübenbrei, 30 bis 40 g, wurde mit etwa 200 ccm Wasser vermengt, mit $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure sehr schwach angesäuert und der Destillation unterworfen. Das etwa 150 ccm betragende Destillat wurde sorgfältig neutralisiert, einer neuerlichen Destillation unterworfen und das Destillat in einer Menge von genau 50 ccm in einem gut kalibrierten Pyknometer von Reischauer-Aubry gesammelt. Die aus dem spezifischen Gewichte ermittelte Alkoholmenge wurde auf das Gesamtgewicht der Rübe vor bezw. nach dem Versuche umgerechnet.

Zur Bestimmung des Alkohols in den einzelnen Destillaten wurde auch die Jodoformreaktion benutzt und weiter die Ausscheidung von Jodoformkrystallen nach Müntz. Bei diesem Verfahren wird dem Destillat krystallisierte Soda und etwas pulverförmiges Jod beigefügt; bei starkem Umrühren in der Abdampfschale bei einer Temperatur von 60° C. setzen sich hexagonale Krystalle von Jodoform an. Nach Duclaux kann man mit dieser Methode 20 mg Alkohol in 10 Liter Wasser bestimmen †); freilich habe ich mich für die einzelnen Bestimmungen nicht mit dieser Methode nach dem Versuche begnügt, sondern den entstandenen Alkohol an einem gröfseren Quantum ermittelt.

Die Zuckerrübe enthielt vor dem Versuche keinen Alkohol. Dafs thatsächlich Äthylalkohol nach Verweilen in der Wasserstoffatmosphäre vorhanden war, stellten wir an einer gröfseren Menge — bis 10 kg — Zuckerrüben fest, welche vollständig sterilisiert, etwa 10 Tage unter einer von einer Wasserstoffatmosphäre abgesperrten sterilisierten Wassersäule gehalten wurden. Nach starker Gärung in dem sterilen Medium — denn es wurden keinerlei Mikroorganismen in demselben konstatiert — wurden sowohl aus dem Wasser, als auch aus der Zuckerrübe, und zwar nach mehrfacher Destillation unter strenger Identifizierung 50 bis 100 ccm Äthylalkohol abdestilliert. Der Siedepunkt wurde mit 78 bis 79° C. und das spezifische Gewicht mit 0,799 bei 15° C. gefunden.

---

*) Pavy, Die Physiologie der Kohlenhydrate, Leipzig 1895.

**) Peska, Listy chemické 1895.

***) Bericht aus der Versuchsstation für Zuckerindustrie I, Prag 1897.

†) Traité de Microbiologie par E. Duclaux, t. III, p. 10.

In der Rübenwurzel bezw. in den Würfeln wurde weiter das Kohlendioxyd bestimmt. Im Kolbeschen Apparate wurde das Kohlendioxyd durch Phosphorsäure frei gemacht, in Kalilauge absorbiert, aus dieser neuerdings durch Phosphorsäure ausgetrieben und sodann gewogen. Die Bestimmung des Kohlendioxyds wurde nach der Methode Kolbe-Fresenius ausgeführt, wobei zu bemerken ist, dafs vor dem Geifslerschen Absorptionsapparate drei U-förmige Röhren sich befanden, von welchen zwei mit Kupfervitriolbimstein gefüllt waren, indes die dritte $CaCl_2$ enthielt.

Es wurde vor dem Versuche in der Zuckerrübenwurzel ein Gehalt von CO_2 = 0,04 — 0,05 % festgestellt; nach den Versuchen mit intramolekularer (anaerober) Atmung wurden 0,06 — 0,08 % CO_2 (umgerechnet auf das ursprüngliche Gewicht der Zuckerrübe) gefunden.

In dem Wasser*), unter welchem die Zuckerrüben gehalten wurden, ermittelten wir den Abdampfrückstand, die Saccharose, den Invertzucker und das Kohlendioxyd nach bekannten Methoden. Bemerkt mufs werden, dafs das Kohlendioxyd durch Phosphorsäure ausgetrieben und im Geifslerschen Apparat gewogen wurde. Der Alkohol wurde nach der bereits erwähnten Methode bestimmt.

3. Die normale und anaerobe Atmung bei wechselnder Temperatur.

Wir geben in folgendem zunächst die Resultate der Versuche mit normaler Atmung im Luftstrome, dann die Resultate der Versuche mit Atmung im Wasserstoffstrome, wie sie an Zuckerrübenwurzeln erhalten wurden, welche nicht in Wasser getaucht waren. In diesen Experimenten handelte es sich somit blofs um die Bestimmung des Kohlendioxyds, welches bei verschiedenen Temperaturen ausgeatmet wurde.

Die Versuche, betreffend die Einwirkung der höheren Temperaturen, wurden in einem gröfseren Thermostaten durchgeführt, welcher mit Glasscheiben an zwei gegenüberliegenden Seiten versehen war, um die Temperatur im Versuchscylinder ablesen zu können. Bei jedem Versuche wurden pro Stunde 5 Liter und zwar entweder kohlendioxydfreie Luft oder Wasserstoff durch 1 bis 2 Stunden durch den Versuchscylinder durchgetrieben. Es ist zu bemerken, dafs, bevor zum eigentlichen Versuche geschritten und das ausgeatmete CO_2 bestimmt wurde, immer 1 bis 2 Stunden lang Luft oder Wasserstoff durch den Versuchscylinder durchgetrieben wurde, um aus der Rübe sowohl als auch aus dem Versuchscylinder das von früher her in denselben befindliche Kohlendioxyd auszutreiben.

*) Das ausgekochte Wasser, welches zu den Versuchen benutzt wurde, war frei von Kohlensäure.

Betreffs der Bestimmung des von der Zuckerrübe ausgeatmeten Kohlendioxyds mufs betont werden, dafs bei höherer Temperatur aus der Rübe ziemlich viel Wasser entweicht. Deshalb liefsen wir die abströmenden Gase erst den Winklerschen Apparat, gefüllt mit konzentrierter Schwefelsäure, und dann zwei U-förmige Röhren, gefüllt mit Vitriolbimstein, passieren. Dann erst traten sie in die Chlorcalciumröhre und von hier in den Geifslerschen Kohlendioxyd-Absorptionsapparat.

Zu bemerken ist noch, dafs bei den Versuchen betreffend die intramolekulare Atmung, bei welchen eine Wasserstoff- oder Stickstoffatmosphäre benutzt wurde (es gilt dies speziell von einem Falle, in dem es sich um die Feststellung der intramolekularen Atmungsintensität bei höheren Temperaturen handelte), immer nach dem Versuche vor dem Wägen aus dem Geifslerschen Absorptionsapparate und aus den U-Röhren der Wasserstoff oder Stickstoff durch kohlendioxydfreie Luft völlig ausgetrieben wurde.

A. Kohlendioxydausscheidung der Zuckerrübenwurzel bei Temperaturen von 1 bis 30°.

Versuche mit nicht sterilisierten Wurzeln.

a) Normale Atmung.

I.

Gewicht der Wurzel 462 g. Normale Entwicklung; vollkommen unverletzt; Varietät: „Wohankas Zuckerreiche"; Temperatur **18** bis **20°** C.; Dauer des Versuches bei permanentem Luftstrom: 8 Stunden; Abgegebenes Kohlendioxyd in 8 aufeinander folgenden Stunden: 14,6 mg, 15,2 mg, 13,0 mg, 10,5 mg, 14,2 mg, 8,6 mg, 9,2 mg, 8,3 mg; Summe in 8 Stunden: 93,6 mg; Mittel, berechnet für 1 Stunde: 11,7 mg; somit für 1 kg Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **25,3** mg.

II.

Dieselbe Zuckerrübenwurzel. Die Temperatur auf **1** bis **3°** C. herabgesetzt. — Dauer des Versuches bei permanentem Luftstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 8,5 mg, 7,3 mg, 6,0 mg, 7,8 mg, 4,4 mg, 4,0 mg, 4,5 mg, 4,2 mg, 3,5 mg, 3,2 mg; Summe in 10 Stunden: 53,4 mg; Mittel, berechnet für 1 Stunde: 5,34 mg; berechnet für 1 kg Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **11,4** mg.

III.

Dieselbe Zuckerrübe. Die Temperatur erhöht auf **30** bis **32°** C. Dauer des Versuches bei permanentem Luftstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 15,2 mg, 16,0 mg, 16,5 mg, 19,4 mg, 18.8 mg, 24,6 mg, 28,3 mg, 26,5 mg, 30,2 mg. 31,4 mg; Summe in 10 Stunden: 226,9 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 22,69 mg, berechnet für 1 kg der Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **49,11** mg.

IV.

Gewicht der Zuckerrübe: 954 g. Dieselbe vollständig unverletzt. Temperatur: **18** bis **20°** C.; Dauer des Versuches bei permanentem Luftstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 18,5 mg, 27,4 mg, 26,5 mg, 19,7 mg, 22,4 mg, 24,5 mg, 23,0 mg, 28,2 mg, 20,6 mg, 22,5 mg; Summe in 10 Stunden: 233,3 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 23,33 mg, berechnet für 1 kg der Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **24,45** mg.

V.

Dieselbe Zuckerrübe; die Temperatur erhöht auf **30** bis **32°** C.; Dauer des Versuches bei permanentem Luftstrome: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 24,5 mg, 28,6 mg, 30,2 mg, 30,6 mg, 36,5 mg, 38,2 mg, 40,4 mg, 32,5 mg, 36,2 mg, 40,5 mg; Summe in 10 Stunden: 338,2 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 33,8 mg, berechnet für 1 kg Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **35,4** mg.

VI.

Dieselbe Zuckerrübe; die Temperatur herabgesetzt auf **1** bis **3°** C.; Dauer des Versuches bei permanentem Luftstrom: 9 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 9 aufeinander folgenden Stunden: 5,4 mg, 6,3 mg, 8,2 mg, 4,5 mg, 6,3 mg, 5,2 mg, 4,4 mg, 5,6 mg, 6,2 mg; Summe in 9 Stunden: 52,1 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 5,78 mg, berechnet für 1 kg der Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **6,06** mg.

b) Anaerobe Atmung.

Die Versuche wurden ebenfalls mit Zuckerrüben vorgenommen. Das Gewicht der in Versuch I bis III verwandten Zuckerrübe, welches ursprünglich 462 g betrug, sank im Verlaufe der Versuche, welche ausschliefslich bei Tage vorgenommen wurden, auf 459 g; in Versuch IV bis VI sank es bei einem anderen Objekt von 954 auf 950 g.

Die Bestimmung des ausgeatmeten Kohlendioxyds erfolgte nur, wie früher, solange der Prozefs sich im normalen Stadium befand. Das vor der Beobachtung entstandene angehäufte Kohlendioxyd wurde durch Wasserstoff vertrieben.

I.

Temperatur: **18** bis **20°** C.; Dauer des Versuches bei permanentem Wasserstoffstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 5,3 mg, 6,2 mg, 6,0 mg, 4,0 mg, 5,5 mg, 6,8 mg, 4,2 mg, 5,4 mg, 6,2 mg, 5,3 mg; Summe in 10 Stunden: 54,9 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 5,4 mg, berechnet für 1 kg der Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **11,9** mg.

II.

Dieselbe Zuckerrübe; die Temperatur herabgesetzt auf **1** bis **3**° C.; Dauer des Versuches bei permanentem Wasserstoffstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 3,5 mg, 2,0 mg, 1,0 mg, 2,2 mg, 2,0 mg, 1,5 mg, 1,0 mg, 1,5 mg. 1,0 mg, — mg; Summe in 10 Stunden: 15,7 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 1,57 mg, berechnet für 1 kg Zuckerrübe pro Stunde: **3,42** mg.

III.

Dieselbe Zuckerrübe; die Temperatur erhöht auf **30** bis **32**° C.; Dauer des Versuches bei permanentem Wasserstoffstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 8,3 mg, 9,2 mg, 7,5 mg, 6,8 mg, 7,3 mg, 8,2 mg, 8,0 mg, 8,2 mg, 8,0 mg, 9,3 mg; Summe in 10 Stunden: 80,8 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 8,08 mg, berechnet für 1 kg Zuckerrübe pro Stunde: **17,6** mg.

IV.

Das Gewicht der Rübe betrug ursprünglich 950 g. Der Versuch schlofs sich unmittelbar an den Normalversuch an. Temperatur: **18** bis **20**° C.; Dauer des Versuches bei permanentem Wasserstoffstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 9,4 mg, 12,5 mg, 13,8 mg, 12,3 mg, 13,6 mg, 10,2 mg, 9,8 mg, 10,5 mg, 10,3 mg, 8,8 mg; Summe in 10 Stunden: 111,2 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 11,12 mg, berechnet für 1 kg der Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **11,70** mg.

V.

Derselbe Zuckerrübenorganismus; die Temperatur erhöht auf **30** bis **32**° C.; Dauer des Versuches bei permanentem Wasserstoffstrom: 10 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 10 aufeinander folgenden Stunden: 12,5 mg, 11,8 mg, 10,6 mg, 15,5 mg, 15,2 mg, 16,8 mg, 18,6 mg, 20,5 mg, 18,3 mg, 24,2 mg; Summe in 10 Stunden: 164,0 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 16,4 mg, berechnet für 1 kg Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **17,2** mg.

VI.

Dieselbe Zuckerrübe; die Temperatur auf **1** bis **3**° C. herabgesetzt: Dauer des Versuches bei permanentem Wasserstoffstrom: 6 Stunden. Erhalten Kohlendioxyd in 6 aufeinander folgenden Stunden: 3,2 mg, 4,0 mg, 3,8 mg, 3,0 mg, 4,5 mg, 3,0 mg; Summe in 6 Stunden: 21,5 mg. Mittel, berechnet für 1 Stunde: 3,58 mg, berechnet für 1 kg Zuckerrübenwurzel pro Stunde: **3,77** mg.

Versuche mit sterilisierter Zuckerrübenwurzel.

Diese Versuche wurden in der Weise angeordnet, dafs die Zuckerrübenwurzel in zwei Hälften geteilt und jede derselben sterilisiert wurde; die eine diente sodann zum Studium der normalen, die andere der intramolekularen Atmung.

VII.

Normale Atmung Durchleiten eines Luftstroms durch 8 Stunden. Gewicht der Rübe: 232 g		Anaerobe Atmung Durchleiten eines Wasserstoffstroms durch 8 Stunden. Gewicht der Rübe 254 g
Erhalten Kohlendioxyd in mg:		
Temperatur 18 bis 20° C.		
In der 1. Stunde	5,8	2,2
„ „ 2. „	6,3	4,3
„ „ 3. „	6,0	4,2
„ „ 4. „	6,4	5,3
„ „ 5. „	7,0	3,2
„ „ 6. „	7,2	6,4
„ „ 7. „	7,8	2,7
„ „ 8. „	6,8	3,5
Summe in 8 Stunden	53,3	31,8
Berechnet für 1 Stunde	6,66	3,975
„ „ 1 kg der Zuckerrübenwurzel	28,70	15,64
Temperatur: 1 bis 3° C.		
In der 1. Stunde	2,6	2,0
„ „ 2. „	2,8	—
„ „ 3. „	2,4	2,5
„ „ 4. „	2,6	—
„ „ 5. „	2,3	2,0
„ „ 6. „	2,5	—
„ „ 7. „	3,6	2,0
„ „ 8. „	2,6	2,7
Summe in 8 Stunden	21,4	11,2
Berechnet für 1 Stunde	2,67	1,4
„ „ 1 kg. der Zuckerrübenwurzel	11,49	5,51
Temperatur: 30 bis 32° C.		
In der 1. Stunde	9,8	6,5
„ „ 2. „	10,5	6,2
„ „ 3. „	14,0	5,3
„ „ 4. „	12,3	4,4
„ „ 5. „	12,2	6,3
„ „ 6. „	14,8	5,2
„ „ 7. „	14,3	7,8
„ „ 8. „	14,0	8,4
Summe in 8 Stunden	101,9 CO_2	50,1 CO_2
Berechnet für 1 Stunde	12,7 „	6,2 „
„ „ 1 kg der Zuckerrübenwurzel	54,7 „	24,4 „

Man glaubt allgemein, dafs, wenn ein Pflanzenorganimus verletzt ist, derselbe intensiver atmet als ein unverletzter, namentlich ist dies neuerer Zeit auf Grund von Versuchen von Stich*) behauptet worden. Die betreffenden Autoren haben jedoch nicht mit bakterienfreien Pflanzenobjekten gearbeitet. Wir haben dagegen beim Vergleich einer in verdünnte Sublimatlösung gelegten, verletzten, bezw. unverletzten Zuckerrübe in betreff ihrer Atmungsintensität das Gegenteil gefunden, die verletzte Rübe atmet weniger als die unverletzte. Und das ist auch einleuchtend: die zerstörten Zellen sind des Atmungsvermögens beraubt. Die Wahrnehmung, dafs ein verletzter Organismus intensiver atme als ein unverletzter, ist auf die Atmungsthätigkeit der Bakterien zurückzuführen, welche sich in den verletzten Zellen ansiedeln und hier den Zelleninhalt zersetzen. Als Beispiel führe ich an, dafs ein Gramm Bact. Hartlebii (auf Trockensubstanz berechnet) in einer Stunde bei einer Temperatur von 25° C. 23 mg CO_2 abgiebt. (Über die Atmungsintensität der Bakterien werden wir in der nächsten Zeit eine gröfsere Studie mitteilen.)

Betrachten wir die gewonnenen Resultate, so bemerken wir vor allem, dafs das Quantum des ausgeatmeten Kohlendioxyds bei normaler Atmung konstant etwa doppelt so grofs ist als bei anaerober. So finden wir bei einer Temperatur von 1 bis 3° C. das per Stunde ausgeatmete Kohlendioxydquantum per Kilogramm Zuckerrübenwurzel zu 6,05 bis 11,49 mg. Bei einer Temperatur von 18 bis 20° C. wurden bei normaler Atmung 24,4 bis 28,7, bei anaerober Atmung 11,7 bis 15,6 mg Kohlendioxyd gefunden. Bei höherer Temperatur, und zwar zwischen 30 und 32° C., wurde wohl in beiden Fällen ein gröfseres Quantum Kohlendioxyd ausgeschieden, doch blieb das relative Verhältnis beider Werte das gleiche, bei der normalen Atmung 35 bis 54 mg, bei der anaeroben 17,2 bis 24,4 mg CO_2.

Die angeführten Thatsachen sind, vom allgemeinen Standpunkte betrachtet, insofern nicht neu, als wir bereits wissen, dafs die Produktion des Kohlendioxyds bei intramolekularer Atmung eine viel geringere ist als bei der normalen, weiter, insofern wir wissen, dafs bei einem Organismus mit veränderlicher Eigenwärme die Produktion von Kohlendioxyd sinkt, wenn die Aufsentemperatur und damit die Eigentemperatur niedriger wird, während homöo-

---

*) Die Atmung der Pflanzen bei verminderter Sauerstoffspannung und bei Verletzungen. Flora 1891.

therme Organismen auf äufsere Abkühlung mit selbstthätiger Wärmeerzeugung reagieren.

Der Einflufs der Wärme auf die Umsetzungen in der Zuckerrübenwurzel hat, wie bereits erwähnt, in der Praxis grofse Bedeutung, und zwar für deren Aufbewahrung. Die Saccharose, als in der Rübe abgelagerter Reservestoff, unterliegt der Zersetzung. Die Ausscheidung des Kohlendioxyds erfolgt sowohl bei der normalen wie der anaeroben Atmung ganz auf Kosten derselben. F. Strohmer*) hat schon im Jahre 1895 in einem sehr interessanten Vortrage auf die Verluste an Zucker hingewiesen, die in den Mieten vom Zeitpunkte der Ernte bis zu ihrer Verarbeitung entstehen.

Leider hat F. Strohmer seine Studie nicht mit allen Belegen veröffentlicht. Seinen Angaben sei nachstehendes entnommen. F. Strohmer benutzte zu seinen Versuchen:

Rübe I im Gewicht von 357,1 g mit einem Zuckergehalt von 16,6 Proz.
„ II „ „ „ 35,26 „ „ „ „ „ 17,8 „
„ III „ „ „ 362,2 „ „ „ „ „ 19,6 „

Die Rüben waren also in ihrem Gewichte ziemlich gleich, in ihrem Zuckergehalte jedoch sehr verschieden. Die stündliche Kohlendioxydabgabe schwankte bei einer Temperatur von 16,7 bis 18,4° C. während 34 tägiger ununterbrochener Beobachtung: bei Rübe I von 7,8 bis 31,1 mg (anfänglich 13,1 mg, am Ende 8,9 mg); bei Rübe II von 9,6 bis 22,6 mg (anfänglich 10,8 mg, am Ende 22,1 mg); bei Rübe III von 5,9 bis 8,3 mg (am Anfang 8,3 mg, am Ende 6,2 mg).

Der zweite Versuch kann, wie der Autor selbst darlegt, nicht als richtig angesehen werden, da sich auf der Zuckerrübe Pilze angesiedelt hatten und die Rübe sich in Zersetzung befand.

Im ganzen stimmen die Resultate der gelungenen Versuche mit unseren, bei 18 bis 20° C. gewonnenen überein. Doch ermöglichen erst unsere Untersuchungen eine klare Vorstellung über die Art und Weise, wie sich die Kohlensäureabgabe der Wurzel bei verschiedener Temperatur, und zwar in normalem und anaerobem Zustande gestaltet. Besonders aufklärend sind die Versuche mit halbierter und sterilisierter Wurzel, wobei die eine Hälfte unter normalen Verhältnissen, die andere anaerob gehalten wurde.

Die gebildete Menge Kohlendioxyd ist nun ein bedeutungsvolles Kriterium für die anaerobe Umsetzung während der Auf-

*) Österr.-ungar. Zeitschr. f. Zuckerind. u. Landwirtschaft, Wien 1895. Die Zuckerverluste der Rüben während ihrer Aufbewahrung. Vortrag, gehalten auf der Generalversammlung des Centralvereins für Rübenzuckerindustrie der österr.-ungar. Monarchie zu Bregenz.

bewahrung der Zuckerrübe vor ihrer Verarbeitung. Wir haben nicht die Absicht, aus diesen Ziffern die Verluste an Zucker, welche sich aus der gefundenen Dissimilation für die Praxis ergeben, näher zu berechnen, und heben blofs hervor, dafs die Menge des abgegebenen Kohlendioxyds innerhalb 30 Tagen per 1000 g Rübe bei einer Temperatur von

1 bis 3° C.	8,2728 g
18 „ 20° „	20,6856 „
28 „ 30° „	39,4560 „

betrug.

B. Kohlendioxydausscheidung bei extremen Temperaturen.

α) Temperaturen unter 0°.

Zu diesen Versuchen wurde eine gesunde Zuckerrübenwurzel von 270 g benutzt. Sie wurde in einen ganz kurzen, sterilisierten Cylinder gebracht, welcher mit der beschriebenen, ebenfalls gründlich sterilisierten Armatur versehen in eine Kältemischung (Eis und Kochsalz) versenkt wurde. Das Kontrollthermometer war in die Zuckerrübe eingestochen. Die Versuche wurden im Winter im ungeheizten Zimmer bei einer Temperatur von 5 bis 10° C. durchgeführt.

In reiner Wasserstoffatmosphäre bei —2° C. atmete der Organismus der Zuckerrübe so unbedeutend, dafs nach zweistündigem Durchleiten von Wasserstoff keine merkliche Menge Kohlendioxyd gefunden wurde. Bei normaler Atmung, in derselben Zeit und Temperatur, wurden 2 mg Kohlendioxyd gefunden. Das Temperaturminimum der normalen Atmung ist somit unter —2° C. gelegen. Bei etwa —4° C. beginnt die Zuckerrübenwurzel zu gefrieren, und die Zellen sterben infolge der Krystallisation des in ihnen enthaltenen Wassers ab.

Es wurde ferner untersucht, ob die Zuckerrübe noch beim Gefrieren Kohlendioxyd produziert. Wir hielten die Zuckerrübe 5 Stunden unter —3 bis 4° C. (eine nachweisbare Menge von CO_2 wurde nicht erhalten).

Es sei bemerkt, dafs die Luft, welche durch den Versuchscylinder durchgeleitet wurde, zuerst eine U-Röhre passierte, die in eine Kältemischung gestellt war. Bekanntlich ist es nicht die Herabsetzung der Temperatur an sich, welche das Absterben der Zelle bewirkt, sondern die Bildung von Eis. Infolge der Krystallisation des Wassers kommt es zu einem Wasserverlust des Protoplasmas und zu einer Zerstörung seiner ganzen Architektur*).

*) Hans Molisch, Untersuchungen über das Erfrieren der Pflanzen. Jena 1897.

β) Temperaturen über 30° C.

Die Temperatur der maximalen Kohlenoxydausscheidung bestimmten wir in der Weise, dafs der gläserne Versuchscylinder samt dem Thermometer in einen kupfernen Thermostaten versenkt wurde, welcher eigens zu diesem Zwecke konstruiert war und die Temperatur im Versuchscylinder abzulesen gestattete. Dem Versuchscylinder wurde während der Versuche Wasserdampf zugeführt, um, so weit als möglich, den Wassergehalt der Zuckerrübe auf gleichmäfsiger Höhe zu erhalten.

Die über 30° C. hinausgehende Temperatur hat bereits einen bedeutenden Einflufs auf die Transpiration der Zuckerrübenwurzel, und wollten wir das Maximum der Atmungsthätigkeit und das Absterben des Protoplasmas durch Wärmewirkung ermitteln, dann durfte das in den Zellen bestehende Konzentrationsverhältnis nicht gestört werden. Vor den Vorlagen befanden sich zwei Absorptionsapparate, System Winkler, mit konzentrierter Schwefelsäure, welche öfters ausgewechselt wurden.

Zu den Versuchen wurde eine gesunde Zuckerrübenwurzel im Gewichte von 232 g *) gewählt. Die Beobachtungsresultate sind folgende.

Die ausgeatmete Menge Kohlendioxyd per Stunde im Strome feuchter Luft betrug:

Normale Atmung.

Erster Tag:	Zweiter Tag:
30 bis 31° C. — 12 mg CO_2.	37 bis 38° C. — 40 mg CO_2.
31 „ 32° „ — 14 „ „	38 „ 39° „ — 42 „ „
32 „ 33° „ — 19 „ „	39 „ 40° „ — 43 „ „
33 „ 34° „ — 21 „ „	40 „ 41° „ — 48 „ „
34 „ 35° „ — 25 „ „	41 „ 42° „ — 48 „ „
35 „ 36° „ — 29 „ „	42 „ 43° „ — 50 „ „
36 „ 37° „ — 36 „ „	

Dritter Tag.	Vierter Tag.
43 bis 44° C. — 51 mg CO_2.	49 bis 50° C. — 46 mg CO_2.
44 „ 45° „ — 56 „ „	50 „ 51° „ — 40 „ „
45 „ 46° „ — 58 „ „	51 „ 52° „ — 39 „ „
46 „ 47° „ — 66 „ „	52 „ 53° „ — 30 „ „
47 „ 48° „ — 68 „ „	53 „ 54° „ — 29 „ „
48 „ 49° „ — 56 „ „	

*) Die Wurzel rührte von einer in üppigem Wachstum begriffenen Rübe her.

Fünfter Tag.

54 bis 55° C.	— 26 mg CO_2.
55 „ 56° „	— 19 „ „
56 „ 57° „	— 18 „ „
57 „ 58° „	— 16 „ „

Sechster Tag.

58 bis 59° C.	— 15 mg CO_2.
59 „ 60° „	— 13 „ „
60 „ 61° „	— 13 „ „

Siebenter Tag.

61 bis 62° C.	— 11 mg CO_2.
62 „ 63° „	— 10 „ „
63 „ 64° „	— 9 „ „
64 „ 65° „	— 9 „ „

Aus den gewonnenen Zahlen ist zu ersehen, dafs das Maximum der normalen Atmung zwischen 46 und 48° C. erreicht wird, wobei 66 bis 68 mg Kohlendioxyd im Verlaufe von 1 Stunde ausgeschieden werden. Darüber hinaus beginnt die Kohlendioxydbildung zunächt langsam, dann von 52 bis 53° C. ab rascher zu sinken, so dafs sie schon bei einer Temperatur von 54 bis 55° C. nur noch 26 mg beträgt. Über 56° C. beginnen die Zellen abzusterben, was durch Braunwerden der Rübe angezeigt wird.

Zur Bestimmung der Tötungstemperatur wählten wir eine Zuckerrübenwurzel von 215 g Gewicht und ermittelten vorher die Menge des bei 30° C. ausgeatmeten Kohlendioxyds, um festzustellen, ob nach Unterbrechung der höheren Temperatur die Wurzel noch normal ist. Bei plötzlicher Herabsetzung der Temperatur auf dieselbe Stufe wie vor dem Versuche mufste dann wieder eine entsprechende Kohlendioxydmenge erhalten werden.

Innerhalb einer Stunde wurden in drei Versuchen bei 30° C. im Mittel 14 mg Kohlendioxyd abgegeben. Die Temperatur wurde hierauf unter fortwährender Zufuhr von Wasserdampf gesteigert und während der sechsstündigen Dauer des Versuches das ausgeatmete Kohlendioxydquantum bestimmt.

Es wurden gefunden:

In der 1. Stunde	52 mg CO_2.
„ „ 2. „	54,5 „ „
„ „ 3. „	56,4 „ „
„ „ 4. „	59,2 „ „
„ „ 5. „	54,5 „ „
„ „ 6. „	52,2 „ „

Am folgenden Tage wurde die Wurzel bei einer Temperatur von 30° C. durch drei Stunden belassen und die Kohlendioxydabgabe pro Stunde zu 12 mg gefunden; also in der That etwa eben so hoch wie vor dem Versuche.

Die Temperatur wurde nun ständig erhöht. Zunächst wurde die Wurzel durch vier Stunden bei 60° C. gehalten. Im Verlaufe dieser

vier Stunden wurden 45 mg CO_2 ausgeatmet. Am dritten Tage wurde die Temperatur durch fünf Stunden bei 62° C. gehalten und hier schon eine geringere Atmungsintensität festgestellt. Es wurden im ganzen nur 40,5 mg CO_2 gefunden.

Am vierten Tage wurde die Temperatur durch fünf Stunden bei 63° C. erhalten und hierbei blofs 30,5 mg CO_2 gefunden *).

Aber auch wenn man weiterhin CO_2-freie Luft durchtrieb, war es möglich, CO_2-Abgabe zu konstatieren, obwohl die Zuckerrübe bereits ganz braun war, ein Beweis, dafs das Protoplasma in den Zellen zum grofsen Teile schon abgestorben war, denn diese Verfärbung entsteht bekanntlich durch die postmortale Oxydation der Chromogene.

Eine beachtenswerte Erscheinung ergab sich bei der bakteriologischen Untersuchung. Die Zuckerrübenwurzel beherbergte nach dem Versuche trotz vollständiger Sterilisation in einer 0,5 proz. Sublimatlösung durch 25 Minuten an der Oberfläche, wie mit Hülfe von Gelatineplatten sichergestellt wurde, zahlreiche Mikroben. Trotz aller Vorsicht scheinen also beim Durchtreiben des Dampfes Bakterien in den Versuchscylinder eingedrungen zu sein, welche sich dann auf der Rübe vermehrten. Wie wir uns überzeugen konnten, handelte es sich um gewisse thermophile, bisher wenig studierte Bacillen.

Die Bestimmung des Tötungspunktes des Zuckerrübenorganismus durch absolut exakte Methoden behalten wir uns für eine spätere Zeit vor. Aber aus dem Ermittelten ist zu ersehen, dafs die Zuckerrübenwurzel durch eine bedeutende Resistenz gegenüber den Einflüssen extremer Temperaturen ausgezeichnet ist, namentlich wenn wir erwägen, dafs die Wurzeln unserer Cerealien und Leguminosen in einem auf 50° C. erwärmten Boden schon in einigen Tagen absterben.

Ob bei dem Absterben der Zuckerrübenwurzel vorwiegend physikalische oder chemische Einflüsse beteiligt sind, ist heute schwer zu sagen **). Es ist nicht wahrscheinlich, dafs die Koagulierung der Eiweifsstoffe ***), hervorgerufen durch höhere Temperatur, die Ursache des Todes ist. Wir kennen ja Pflanzen, die schon bei einer Temperatur von 20 bis 40° C. absterben, und weiter

*) Ich mufs hier bemerken, dafs die Versuche nicht in einem Zuge durchgeführt wurden, sondern dafs dieselben stets mehrere Tage erforderten. Jedesmal aber wurde vor dem eigentlichen Versuche das angehäufte CO_2 durch ein mindestens zweistündiges Durchtreiben von Luft, bezw. Wasserstoff entfernt, ehe an die Feststellung der Atmungsintensität geschritten wurde,.

**) W. Pfeffer, Pflanzenphysiologie. Leipzig 1901, II. Band. — N. v. Chudiakow, Beiträge zur Kenntnis der intramolekularen Atmung. Landw. Jahrbücher XXIII, 1894.

***) Otto Cohnheim, Chemie der Eiweifskörper. Braunschweig 1900.



solche Pflanzen, die noch bei 75° C. vegetieren. Die Ursachen des Todes durch supramaximale Temperaturen sind uns unbekannt.

Wir haben gesunde, frische Wurzeln der Zuckerrübe in die Sterilisierungsapparate versenkt und nach sechsstündiger Sterilisation, Auskühlenlassen und Durchschweifen in 0,5 proz. Sublimatlösung neuerlich dahin geprüft, ob sie beim Durchleiten von Luft Kohlendioxyd abgeben. Im Verlaufe von vier Stunden wurden nur 8 mg CO_2 gefunden, ein Quantum, das man nicht mehr als Produkt der Atmung ansehen kann. Eine postmortale Atmung der Zuckerrübe wurde also nicht konstatiert.

Breinstein und Reinke*) beobachteten wohl eine postmortale Entwickelung des CO_2 beim Pflanzenorganismus, was aber Johannsen**), Detmer***), Pfeffer†), Kreusler††) und Klausen†††) zu bestätigen nicht in der Lage waren.

Die Beeinflussung der Intensität der anaeroben Atmung durch Einwirkung supramaximaler Temperaturen wurde in der oben angeführten Weise geprüft, nur mit dem Unterschiede, dafs die Zuckerrübenwurzel in sauerstofffreies Wasser getaucht und Stickstoff durch die Versuchscylinder getrieben wurde. Dabei wurden die Versuchsbedingungen von dem Gesichtspunkt aus gewählt, das Experiment den analogen Versuchen mit normaler Atmung möglichst gleich zu gestalten.

Das Gewicht der Zuckerrübe betrug 225 g. Sie wurde selbstverständlich sterilisiert. Es war notwendig, nach Abschlufs des Versuches die Menge des im Wasser gelösten CO_2 zu bestimmen. Unsere Beobachtungen gingen von einer Temperatur von 30° aus und dauerten für einen Grad vier Stunden.

Es wurden an ausgeatmetem Kohlendioxyd durchschnittlich pro Stunde gefunden:

Bei 30 bis 31° C — 8 mg		Bei 50 bis 51° C — 33 mg
„ 35 „ 36 „ — 17 „		„ 55 „ 56 „ — 16 „
„ 40 „ 41 „ — 27 „		„ 60 „ 61 „ — 7 „
„ 45 „ 46 „ — 36 „		

Die anaerobe Atmung der Zuckerrübenwurzel erreichte somit ihr Maximum bei 45 bis 46° C. Es wurden durchschnittlich pro

*) Berichte d. deutsch. botanischen Gesellschaft 5 (1887).
**) „Botanische Zeitung“ 1887, Nr. 46.
***) Landw. Jahrbücher 11.
†) Pfeffer, Beiträge zur Kenntnis der Oxydationsvorgänge in der lebenden Zelle 1889.
††) Landw. Jahrbücher 19, 699, 33.
†††) Daselbst 19, 892.

Stunde 36 mg CO_2 gefunden. Bei der Atmung in Gegenwart von Sauerstoff wurde oben die höchste Intensität bei 46 bis 48° C. sichergestellt und zwar zu 66 bis 68 mg Kohlendioxyd pro Stunde.

Bei der Untersuchung des Einflusses der höheren Temperatur auf die Intensität der Atmung ist aufsergewöhnliche Vorsicht notwendig. Die Wurzeln der Zuckerrübe müssen gründlich sterilisiert sein, und es ist erforderlich, nach dem Versuche sicherzustellen, dafs die Anwesenheit von Mikroben völlig ausgeschlossen war. Wir hatten Gelegenheit, zu beobachten, dafs bei 50° C. eine bestimmte Art von Mikroben, deren Beschreibung wir uns für einen späteren Zeitpunkt vorbehalten, kräftig zu wuchern und die Saccharose zu zersetzen begann.

Bisher wurde den im Boden stark verbreiteten thermophilen Bacillen, die an den Wurzeln der Pflanzen nachweisbar sind, geringe Aufmerksamkeit geschenkt. Auf der Zuckerrübenwurzel finden sich mehrere Arten solcher thermophilen Bacillen.

C. Über das Konstantbleiben des Quotienten $\frac{An}{N}$ bei verschiedenen Temperaturen.

Aus Tabelle I (siehe S. 481) ist das Verhältnis zwischen der anaeroben und normalen Atmung bei verschiedenen Zuckerrübenwurzeln und für dieselbe Wurzel bei drei verschiedenen Temperaturen (1 bis 3°, 18 bis 20°, 30 bis 32° C.) ersichtlich. Die Resultate der neun Beobachtungen stimmen im ganzen mit den Beobachtungen von Wortmann*), Wilson**), Möller***), Borodin†), Stich††), Clausen†††), Amm†*) und Chudiakow††*).

Die Experimente, bei denen extreme Temperaturen zur Anwendung gelangten, führen wir nicht an, weil hier das normale und anaerobe Atmungsexperiment nicht an einem und demselben

---

*) Wortmann, Arbeiten d. botan. Instituts zu Würzburg 2, 500—520.

**) Wilson, Untersuchungen aus dem botan. Institut zu Tübingen 1, 645—656.

***) Möller, Berichte der deutschen botan. Gesellschaft 2, 313 bis 318.

†) Borodin, Botanische Zeitung 1881, S. 127.

††) Stich, Flora 1891, S. 22—25.

†††) Clausen, Dr. H., Beiträge zur Kenntnis der Atmung der Gewächse und des pflanzlichen Stoffwechsels; Landw. Jahrbücher 19, 893.

†*) Amm, Ant., Untersuchungen über die intramolekulare Atmung der Pflanzen; Pringsheims Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik 15, Heft 1.

††*) Chudiakow, Dr. N. v., Beiträge zur Kenntnis der intramolekularen Atmung. Landw. Jahrbücher 23, 333.

Tabelle I.

Durchschnittliche Menge des abgegebenen CO_2 bei normaler und anaerober Atmung für 1000 g Zuckerrübenwurzel pro Stunde in Milligramm bei gleichem Strome von atmosphärischer Luft oder Wasserstoff (5 Liter pro Stunde).

Nummer des Versuches	Gewicht der Rübe in Gramm	Temperatur	Normale Atmung	Anaerobe Atmung	$\frac{An}{N}$
1	462	1 bis 3°	11,4	3,46	0,303
2	462	18 „ 20°	25,3	11,9	0,470
3	462	30 „ 32°	49,11	17,6	0,358
4	954	1 „ 3°	6,05	3,77	0,623
5	954	18 „ 20°	24,45	11,70	0,478
6	954	30 „ 32°	35,4	17,2	0,485
7	232, 254	1 „ 3°	11,49	5,5	0,478
8	232, 254	18 „ 20°	28,73	15,6	0,542
9	232, 254	30 „ 32°	54,8	24,4	0,445

Organismus durchgeführt wurde. Denn wir hatten schon Gelegenheit zu erkennen, dafs die Atmungsintensität der Zuckerrübenwurzel, auf ein bestimmtes Gewicht der Rübe bei gleicher Temperatur und gleicher Feuchtigkeit bezogen, keineswegs gleich ist. Worin diese Verschiedenheit ihren Grund hat, sind wir mit Sicherheit zu sagen nicht in der Lage.

4. Intensität der Atmung der Zuckerrübenwurzeln in den einzelnen Entwickelungsstadien.

Auf einem Versuchsfelde bauten wir Zuckerrüben, und zwar wählten wir hierzu „Wohankas Zuckerreiche“. Der Charakter des Bodens war ein gleichmäfsiger. Er wurde mit wasserlöslicher Phosphorsäure, Kali- und Chilisalpeter gedüngt. Nach einer bestimmten Vegetationsdauer wurden einzelne Rüben aus dem Boden gezogen, nach gründlicher Reinigung gewogen und zum Atmungsversuch benutzt. Stets wurden unverletzte, blofs ihrer Blattstiele knapp am Wurzelkopfe entledigte Rüben verwendet. Die Versuche wurden im übrigen unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

a) Die Pflänzchen im ersten Stadium der Entwickelung.

Vegetationsdauer 25 Tage.

Gewicht der Blätter von 100 Pflanzen . . . . 26,8 g
Gewicht der Wurzeln von 100 Pflanzen . . . . 4,2 „
Gewicht der Wurzeln von 100 Pflanzen an Trockensubstanz . 0,34 „

25,8 g der Würzelchen atmeten innerhalb 18 Stunden bei einer Temperatur von 25 bis 26° C. Kohlendioxyd in Milligramm aus*):

Erster Tag.		Zweiter Tag.	
In der 1. Stunde	8,8 mg	In der 7. Stunde	10 mg
„ „ 2. „	9,5 „	„ „ 8. „	12 „
„ „ 3. „	8 „	„ „ 9. „	13 „
„ „ 4. „	10 „	„ „ 10. „	11 „
„ „ 5. „	11 „	„ „ 11. „	10 „
„ „ 6. „	12 „		

Dritter Tag.		Vierter Tag.	
In der 12. Stunde	14 mg	In der 16. Stunde	14 mg
„ „ 13. „	13 „	„ „ 17. „	13 „
„ „ 14. „	12 „	„ „ 18. „	10 „
„ „ 15. „	13 „		

In Summa innerhalb 18 Stunden 204,3 mg,
somit innerhalb einer Stunde 11,35 „

1000 g Würzelchen atmeten in einer Stunde aus: 439,92 mg. Dies ergiebt, berechnet auf Trockensubstanz, pro 100 g und Stunde 543,6 mg CO_2.

b) Pflanzen im zweiten Stadium der Entwickelung.

Vegetationsdauer 50 Tage.

Gewicht der Blätter von 10 Pflanzen . . . . . 285 g
Gewicht der Wurzeln . . . . 32 „
Gewicht der Trockensubstanz . . . . 3,6 „

31,2 g Wurzeln gaben an Kohlendioxyd im Verlaufe von 12 Stunden bei 25 bis 26° C. ab:

In der 1. Stunde	6 mg	In der 7. Stunde	8 mg
„ „ 2. „	5 „	„ „ 8. „	7 „
„ „ 3. „	7 „	„ „ 9. „	7 „
„ „ 4. „	3 „	„ „ 10. „	6 „
„ „ 5. „	8 „	„ „ 11. „	5 „
„ „ 6. „	8 „	„ „ 12. „	4 „

In Summa innerhalb 12 Stunden 74 mg
Innerhalb einer Stunde 6,17 mg

1000 g der Wurzeln atmeten somit innerhalb einer Stunde bei einer Temperatur von 25 bis 26° C. 197,75 mg aus. Berechnet auf 100 g Trockensubstanz pro Stunde: 175,78 mg CO_2.

*) Innerhalb einer Stunde gingen 5 Liter Luft durch den Apparat.

c) Zuckerrüben im dritten Stadium der Entwickelung.

Vegetationsdauer 75 Tage.

Gewicht des Blattwerks und des Blattstiels einer Pflanze . . 188 g
Gewicht der Wurzeln . . . . 84 g
Gewicht der Wurzeln an Trockensubstanz . . . . 8,03 g

82 g der Wurzeln gaben innerhalb 12 Stunden bei 25 bis 26° C. ab:

In der 1. Stunde	6 mg	In der 7. Stunde	6 mg
„ „ 2. „	4 „	„ „ 8. „	2 „
„ „ 3. „	5 „	„ „ 9. „	4 „
„ „ 4. „	4 „	„ „ 10. „	3 „
„ „ 5. „	3 „	„ „ 11. „	4 „
„ „ 6. „	5 „	„ „ 12. „	3 „

In Summa innerhalb 12 Stunden 49 mg, somit innerhalb einer Stunde bei einer Temperatur von 25 bis 26° C. 4,083 mg.

1000 g der Wurzel atmeten somit innerhalb einer Stunde **49,79** mg CO_2 aus; berechnet auf 100 g der Trockensubstanz **52,09** mg.

d) Zusammenfassung.

Aus diesen Beobachtungen ist ersichtlich, dafs die zarten Würzelchen der Zuckerrübe im ersten Stadium der Entwickelung sich durch eine ungemein intensive Atmung auszeichnen. So geben 1000 g Würzelchen nach 25 tägiger Vegetation bei 25 bis 26° C. 439,92 mg Kohlendioxyd innerhalb einer Stunde ab. Mit dem Fortschreiten der Entwickelung sinkt die Atmungsintensität der Zuckerrübenwurzel sehr merklich. Nach 50 Tagen der Vegetationsdauer atmen 1000 g nur 197,75 mg, und nach 75 Vegetationstagen nur noch 49,79 mg Kohlendioxyd pro Stunde aus. Eine normal entwickelte Zuckerrübenwurzel atmet bei abgeschlossener Entwickelung im Monate September mit verhältnismäfsig noch geringerer Intensität, und zwar wurden auf 1000 g Wurzeln pro Stunde bei einer Temperatur von 25 bis 26° C. nur 30 bis 50 mg Kohlendioxyd gefunden. Die Zuckerrübenwurzel bekundet übrigens im Anfangsstadium ihrer Entwickelung nicht nur eine besonders hohe Atmungsintensität, sondern es erreicht, wie wir uns überzeugen konnten, auch die Energie der Assimilation des Kohlendioxyds durch die Chlorophyllorgane in dieser Zeitperiode den Höhepunkt.

Wir haben absichtlich eine Temperatur von 25 bis 26° C. angewendet, um die Dissimilationsprozesse kennen zu lernen, denn inner-

halb der Grenzen von 25 bis 30° C. liegt das Optimum der Assimilation des CO_2 durch die Chlorophyllapparate*).

Sehr klar treten uns die Dissimilationsverhältnisse entgegen, wenn wir die ausgeatmete Kohlendioxydmenge pro Stunde auf die Trockensubstanz der Zuckerrübenwurzel berechnen. Auf 100 g Trockensubstanz entfielen an ausgeatmetem CO_2 pro Stunde bei 25 bis 26° C. in Milligramm.

I.	Im ersten Stadium der Entwickelung	543,6	mg
II.	Im zweiten Stadium der Entwickelung	175,78	„
III.	Im dritten Stadium der Entwickelung	52,09	„
IV.	Im vierten Stadium der Entwickelung	31	„

Im ersten und zweiten Stadium entwickelt der Rübenorganismus das Blattwerk in mächtiger Weise, dafür bleibt das Gewicht der Wurzel klein. Das Gewicht der Blätter beträgt bis zum Zehnfachen des Gewichtes der Rübe. Im ersten und zweiten Stadium erreicht die ausgeatmete CO_2-Menge eine bedeutende Höhe, und dies fällt in auffälliger Weise mit der erhöhten Assimilation des Kohlendioxyds durch die Chlorophyllapparate zusammen. Berechnen wir nämlich das Quantum des assimilierten CO_2 auf 100 g reiner Blattsubstanz in den verschiedenen Stadien der Entwickelung, dann ergiebt sich der höchste Wert ebenfalls in dem ersten Abschnitte der Vegetationsentwickelung.

In der Periode, in der sich bereits die Saccharose in der Zuckerrübenwurzel in inaktivem Zustande abgelagert hat, und in welcher die Transformation der Reservestoffe aus den Blättern in der Wurzel beendet ist, besitzt die Rübenwurzel nur noch eine geringe Atmungsintensität. Und diese sinkt noch beim Absterben der Chlorophyllapparate.

Die Zuckerrübenwurzel befindet sich dann in einer Art Winterschlaf und wartet auf die Erweckung zu neuem Leben durch genügende Feuchtigkeit und Wärme. Es ist dies ein Seitenstück zu der bekannten Erscheinung, dafs auch bei den Säugetieren, die sich im Winterschlafe befinden, die Atmungsintensität aufserordentlich sinkt.

e) Der Anteil der einzelnen Teile des Rübenkörpers an der Kohlendioxydbildung.

Die für das neue Leben vorrätig gehaltene Energie findet sich im obersten Teil des Rübenkörpers aufgespeichert. Untersucht

*) Über die Assimilation des Kohlendioxyds durch Zuckerrübenblätter und die Entstehung von Zucker bei Einwirkung verschiedener Temperaturen erscheint ehestens eine umfangreiche Arbeit.

man die Atmungsintensität der verschiedenen Teile der Zuckerrübenwurzel, so findet man hier die gröfste Atmungsleistung, wie die nachfolgenden Versuche lehren.

Für dieselben wurden zehn gleichmäfsig gebaute Rüben der Varietät „Wohankas Zuckerreiche", welche ein Gewicht von 620 bis 650 g hatten, gewählt. Das Gesamtgewicht der zehn Rübenexemplare betrug 6350 g.

Die Zuckerrübenwurzel wurde in fünf Teile geteilt und zwar in:

		Gesamtgewicht
I. Den Oberkörper	1. Kopf ohne Blattstiele	706 g
	2. Hals, hypocotyles Stengelglied	1910 „
II. Mittelkörper		2060 „
III. Unterkörper		1234 „
IV. Schwanz		440 „

Die einzelnen Teile enthielten an Saccharose in Prozenten:

I. Oberkörper	1. Kopf	14,8 Proz.
	2. Hals	16,0 „
II. Mittelkörper		16,4 „
III. Unterkörper		15,6 „
IV. Schwanz		14,3 „

Die einzelnen Teile wurden in einer 0,5 proz. Sublimatlösung sterilisiert und in geräumige Cylinder in nachfolgenden Gewichten versenkt:

I. Oberkörper	1. Kopf	588 g
	2. Hals	1624 „
II. Mittelkörper		1753 „
III. Unterkörper		1032 „
IV. Schwanz		362 „

Nach zweistündigem Durchtreiben von CO_2-freier atmosphärischer Luft (5 Liter pro Stunde) durch jeden der Versuchscylinder wurde das ausgeatmete Kohlendioxyd bestimmt.

Es lieferten pro Stunde bei 25° C.

		CO_2
I. Oberkörper	1. Kopf	26,5 mg
	2. Hals	62,3 „
II. Mittelkörper		38,5 „
III. Unterkörper		29,5 „
IV. Schwanz		9,2 „

Berechnet auf 1000 g atmen somit die einzelnen Teile der Zuckerrübe folgende Kohlendioxydmengen pro Stunde aus:

		CO_2
I. Oberkörper	1. Kopf	45,1 mg
	2. Hals	38,3 „
II. Mittelkörper		21,9 „
III. Unterkörper		28,6 „
IV. Schwanz		25,4 „

Wie man sieht, zeichnet sich der Kopf durch ungewöhnliche Atmungsintensität aus; auf 1000 g Gewicht berechnet, bildet er 45,1 mg CO_2, also eine verhältnismäfsig bedeutendere Menge als der Mittel- und Unterkörper. Aber auch der Hals, in dem sich die Adventivknospen befinden, zeichnet sich durch besondere Atmungsthätigkeit aus.

Eine damit vielleicht in Beziehung stehende interessante Thatsache ist, dafs sich im Safte des Kopfes nach der Methode Fermis*) proteolytische Enzyme nachweisen lassen. Der Saft der mittleren und unteren Partie des Körpers der Zuckerrübenwurzel ergab bei gleicher Prüfung nur eine verhältnismäfsig geringe Verflüssigung der Karbolgelatine.

5. Der Chemismus der anaeroben Atmung.

Für die Beweiskraft unserer Beobachtungen war es von entscheidender Bedeutung, darzuthun, dafs es thatsächlich die Zuckerrübenwurzel ist, die anaerob atmet, und keineswegs etwa die verschiedenen Mikrobenarten, die ihr anhaften und Zersetzung der Saccharose bewirken. Es kamen da namentlich nachstehende Arten in Betracht, deren Vorkommen auf der Zuckerrübenwurzel wir in der That beobachtet haben: Bacillus viscosus sacchari und Laxas Clostridium gelatinosum, zwei Mikrobenarten, welche bei 30 bis 40° C. den Zuckerrübensaft in Gärung versetzten**). Insbesondere wurde Clostridium gelatinosum Laxa in der nach Beendigung des Versuches getrübten Lösung öfter und zwar auch nach Sterilisation mit 0,5 proz. Sublimatlösung beobachtet. Sämtliche Experimente, welche nach Beendigung des Versuchs mit anaerober Atmung in der Lösung lebensfähige Keime zeigten, wovon wir uns stets durch Petrischen Plattengufs überzeugten, wurden aus unserer Beobachtungsreihe ausgemerzt bezw. mit frischem Material wieder-

*) Fermi, Archiv für Hygiene 1890. Die Leim und Fibrin lösenden und die diastatischen Fermente der Mikroorganismen.

**) Daneben beobachteten wir in einem Falle auch Leuconostoc. Bacillus viscosus sacchari bildet in Rohrzuckerlösungen Schleim. Er ist anaerob und dürfte mit dem von Kramer (Monatshefte für Chemie 10, 467) beschriebenen identisch sein. Bei der Vergärung von Invertzucker soll nach Horsin-Déon zuerst die Fruktose angegriffen werden. Von vielen Forschern wurde bei der schleimigen Gärung des Zuckerrübensaftes auch Mannit gefunden. Über das Clostridium gelatinosum, welches Laxa isoliert hat, werden wir an einer anderen Stelle berichten. Dieses Bacterium hat sehr interessante Eigenschaften, auf welche übrigens vielfach schon Laxa hingewiesen hat (Centralblatt für Bakteriologie II, 2: Über einen thermophilen Bacillus aus Zuckerfabrikationsprodukten).

holt. Die Anwesenheit von Mikroben verriet sich in dem Wasser, in das die Zuckerrübe versenkt war, immer am fünften oder siebenten Tage. Die Flüssigkeit trübte sich milchig.

Nach Abschlufs der anaeroben Atmungsthätigkeit, die bis 25 Tage dauerte, war die Zuckerrübenwurzel stets vollkommen gesund und unverletzt, nur die oberste Partie der Rübe, wohin die wasserstoffzuführende Röhre reichte, war manchmal — immer nur nach längerer Zeit — von den Quecksilberdämpfen alteriert, so z. B. beim dritten Versuche, der 21 Tage dauerte, und beim sechsten Versuche, der 25 Tage währte.

Es gelang uns schliefslich nach langwieriger und mühevoller Arbeit, unter 21 Versuchen 6 durchzuführen, in denen die Flüssigkeit, in welche die Rübe versenkt war, nicht nur vollkommen klar blieb, sondern auch keinerlei lebensfähige Mikroben aufwies.

Es konnte in diesen Fällen bei Impfung auf verschiedenen Nährmedien, weder auf Gelatine noch auf Agar irgendwelche Kolonienentwickelung beobachtet werden.

Der sechste Versuch wurde überdies in der Weise durchgeführt, dafs die Zuckerrübenwurzel statt in Wasser in eine sehr verdünnte Sublimatlösung getaucht wurde*); die Konzentration betrug 0,05 Proz. Th. Bokorny hat zwar darauf hingewiesen, dafs schon eine Konzentration von 0,02 Proz. Sublimat die Gärkraft der Zymase aufhebt, allein nichtsdestoweniger war auch in dieser Konzentration von 0,05 Proz., welche allerdings durch den Wassergehalt der Zuckerrübe fast auf die Hälfte verdünnt erschien, die Gärwirkung, wenngleich von geringerer Intensität, immerhin deutlich wahrnehmbar. In 25 Tagen wurden bei einem Rübengewichte von 364,3 g 0,7396 g CO_2 ausgeatmet und in derselben Zeit 0,7982 g Alkohol gebildet.

Aus der nachstehenden Tabelle ersehen wir die Resultate der sechs ausgeführten Experimente bei einer Temperatur von 20 bis 22° C.

Das Kohlendioxyd wurde täglich durch Wasserstoff ausgetrieben und gewogen.

Die Menge des gefundenen Alkohols ist insofern nicht absolut

*) Dieser Versuch beweist die Gärfähigkeit der Zuckerrübenwurzel bei der anaeroben Atmung in einem Medium, in welchem das Leben von Mikroben unmöglich ist, da wir, mit Richet zu sprechen (Compt. rend. 117, 637), eine Konzentration anwandten, welche die „Dose antigénétique“ und „Dose antibiotique“ weit übertraf. S. auch O. Emmerling: Die Zersetzung stickstofffreier organischer Substanzen durch Bakterien. Braunschweig 1902, S. 36.



Tabelle II.

		Analyse der Rübe vor dem Versuche				Analyse der Rübe und der Lösung nach dem Versuche								
Nr. des Versuches	Dauer des Versuches	Gewicht der Rübe vor d. Versuche	Saccharose in der Rübe	Invertzucker in der Rübe	Trocken-substanz	Menge des CO_2	Menge des Alkohols	Gewicht der Rübe	Trocken-substanz in der Rübe	Saccharose in der Rübe	Invertzucker in der Rübe	Trocken-substanz in der Lösung	Saccharose in der Lösung	Invertzucker in der Lösung
	Tage	g	Proz.	Proz.	Proz.	g	g	g	Proz.	Proz.	Proz.	g	g	g
1	8	351,3	16,97	0,059	24,21	3,5160	4,2631	362,2	18,49	11,78	0,148	12,3720	9,3919	0,9898
2	10	423,9	15,59	0,052	23,38	3,2930	3,3506	418,5	16,54	9,18	0,158	22,4780	17,7049	1,2160
3	21	413,0	14,42	0,044	21,90	5,5524	5,4704	355,4	12,25	5,68	0,125	35,4400	27,8768	2,5340

Tabelle III.

Nr. des Versuches	Dauer des Versuches	Gewicht der Rübe	Gewicht der Trocken-substanz	Gewicht der Saccharose	Ausge-atmetes CO_2	Gebildeter Alkohol	Summe des Alkohols und des CO_2	Alkohol und CO_2 auf Saccharose umgerechnet	Verlust an Trocken-substanz nach dem Versuche		Verlust an Saccharose nach dem Versuche		Menge des gebildet. Alkohols für CO_2 = 100	Anmerkung
	Tage	g	g	g	g	g	g	g	g	Proz.	g	Proz.		
4	5	218,8	—	—	1,5460	1,7537	3,2997	—	—	—	—	—	113,4	Rübe in 0,05 proz. Sublimatlösung
5	6	352,9	—	—	1,0221	1,2071	2,2292	—	—	—	—	—	118,1	
6	25	364,3	—	—	0,7396	0,7982	1,5378	—	—	—	—	—	107,9	
1	8	351,3	85,0393	59,8828	3,5160	4,2631	7,7791	7,3901	5,7732	6,78	6,7023	11,19	121,2	
2	10	423,9	99,0968	66,3802	3,2930	3.3506	6,6436	6,3114	7,4928	7,56	8,1644	12.29	101,7	
3	21	413,0	90,4379	59,7685	5,552	5,4704	11,022	10,470	11,6103	12,83	8,7335	14,61	98,5	

richtig, als er fuselhaltig war, somit höhere Alkohole enthielt, die ein gröfseres spezifisches Gewicht besitzen als der Äthylalkohol.

Ob andere Gase aufser Kohlendioxyd in dem gasförmigen Gärungsprodukte vertreten waren, insbesondere Methan und Stickstoff, sind wir nicht mit voller Bestimmtheit zu sagen im stande, doch könnte es sich nur um unbedeutende Mengen gehandelt haben. Wir haben wenigstens bei der Analyse des entstandenen Gases weder Methan noch Stickstoff gefunden.

Die behufs anaerober Atmung in Wasser versenkten Zuckerrüben begannen bei einer Temperatur von 20 bis 22° innerhalb 24 Stunden zu gären. Am zweiten und dritten Tage erreichte die Gärung einen ziemlich hohen Grad. Die Saccharose in der Zuckerrübenwurzel wurde durch Invertase hydrolytisch in Invertzucker übergeführt, welcher dann zu Alkohol und Kohlendioxyd vergoren wurde. Der Mechanismus der Gärung läfst sich durch die bekannten Gleichungen ausdrücken:

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O = 2C_6H_{12}O_6$$
$$2C_6H_{12}O_2 = 4CO_2 + 4C_2H_5 . OH$$

Bei der alkoholischen Gärung der Glukose kommen auf 100 g CO_2 104,5 g Alkohol; wir finden in unseren Versuchen ein ähnliches Verhältnis:

Versuch 3	98,5	Versuch 4	113,4
„ 2	101,7	„ 5	118,1
„ 6	107,9	„ 1	121,2

Wir hielten es ferner für nötig, zu untersuchen, ob sich nicht etwa Bernsteinsäure und Glycerin bilden, welche, wie wir wissen, als Nebenprodukte der alkoholischen Hefegärung regelmäfsig entstehen. Zu diesem Zwecke überliefsen wir Zuckerrübenwurzeln im Gewichte von 10 kg, nach gründlicher Sterilisation, in einem grofsen Glascylinder in sterilisiertem Wasser unter einer Wasserstoffatmosphäre durch 14 Tage der Selbstgärung. Es trat starke Kohlendioxydentwicklung ein. Die Lösung enthielt aber nur ein geringes Quantum von Glycerin; Bernsteinsäure wurde nicht nachgewiesen. Der Versuch bedarf indessen der Wiederholung, auch wäre die Menge des Glycerins quantitativ zu bestimmen.

Die Zellmembranen der Zuckerrübe enthalten Hemicellulosen, darin das Araban, Xylan und Galaktan*), von welchen die ersten beiden, wie bekannt, durch Hydrolyse in Pentosen (Arabinose und Xylose), die letztere in Hexose (Galaktose) übergehen.

*) Stoklasa, Über die Verbreitung und biologische Bedeutung der Furfuroide. Akademie der Wissenschaften in Wien 1898. — Stoklasa, Über die physiologische Bedeutung der Furfuroide im Pflanzenorganismus. Bot. Centralblatt 1899.

Beide Pentosen, die Arabinose und Xylose, reduzieren sehr stark die Fehlingsche Lösung; nach Stone*) entsprechen 1,95 mg Cu einem Milligramm Arabinose.

Schon mit A. Vyskočil untersuchten wir in unserem Laboratorium, ob sich etwa in der Flüssigkeit, in welcher die Zuckerrübe anaerob atmete, gelöste Pentosen vorfinden. Furfurol konnte zwar aus einer gröfseren Partie der Lösung erhalten werden, doch keine wägbare Menge an Phloroglucid. Auch Galaktose haben wir in der Lösung nicht gefunden. Ihr Vorhandensein wurde mittels der Schleimsäurereaktion geprüft. Wir haben diesen Versuch jüngst wiederholt und die Ergebnisse der Arbeit, welche A. Vyskočil im hiesigen Laboratorium ausgeführt hat, vollkommen bestätigen können.

Wir gehen nun an die Erläuterung der chemischen Gesamtbilanz bei dem anaeroben Stoffwechsel.

Je nachdem man die Menge des gebildeten Alkohols und Kohlendioxyds mit der Abnahme der Sacharose (a) oder der Trockensubstanz (b) vergleicht, ergeben sich etwas verschiedene Werte.

Versuch 1. (Rübengewicht 351,3 g.)

Verlust an Saccharose	6,7023 g
„ „ Trockensubstanz	5,7732 „

a) Die Hydrolyse von 6,7023 g Saccharose erfordert 0,3527 g H_2O.

Der entstandene Invertzucker im Gewichte von 7,055 g entwickelt bei der Gärung an Alkohol und Kohlendioxyd

	Berechnet:	Gefunden:
C_2H_5OH	3,6059 g	4,2631 g
CO_2	3.4491 „	3,5160 „
	7,0550 g	7,7791 g

b) Rechnen wir, dafs der Verlust der Trockensubstanz blofs auf die vergorene Saccharose entfällt, so erhalten wir:

Die Hydrolyse der Trockensubstanz (Saccharose) im Gewichte von 5,7732 g erfordert 0,3038 g Wasser.

An Invertzucker würden daher entstehen 6,077 g.

Durch die Vergärung bildet sich an Alkohol und Kohlendioxyd:

	Berechnet:	Gefunden:
C_2H_5OH	3,1060 g	4,2631 g
CO_2	2,9709 „	3,5160 „
	6,0769 g	7,7791 g

*) Berichte der deutsch. chem. Gesellschaft 3.

Versuch 2. (Rübengewicht 423,9 g.)

Verlust an Saccharose . . . . 8,1644 g
„ „ Trockensubstanz . . . . . 7,4928 „

a) Die Hydrolyse von 8,1644 g Saccharose erfordert 0,4297 g H_2O. Der Invertzucker im Gewichte von **8,5941 g** bildet bei der Gärung an Alkohol und Kohlendioxyd:

	Berechnet:	Gefunden:
C_2H_5OH	4,3925 g	3,3506 g
CO_2	4,2016 „	3,2930 „
	8,5941 g	6,6436 g

b) Die Hydrolyse von 7,4928 g Trockensubstanz (als Saccharose gerechnet) erfordert 0,3943 g H_2O. An Invertzucker würden daher entstehen 7,8871 g. Durch die Vergärung würde daher an Alkohol und Kohlendioxyd gebildet:

	Berechnet:	Gefunden:
C_2H_5OH	4,0312 g	3,3506 g
CO_2	3,8559 „	3,2930 „
	7,8871 g	6,6436 g

Versuch 3. (Rübengewicht 413 g.)

Verlust an Saccharose . . . . 8,7335 g
„ „ Trockensubstanz . . . . . 11,6103 „

a) Die Hydrolyse von 8,7335 g Saccharose erfordert 0,4596 g H_2O. Der Invertzucker im Gewichte von **9,1931 g** bildet bei der Gärung an Alkohol und Kohlendioxyd:

	Berechnet:	Gefunden:
C_2H_5OH	4,6987 g	5,4704 g
CO_2	4,4944 „	5,5520 „
	9,1931 g	11,0224 g

b) Die Hydrolyse der Trockensubstanz (als Saccharose berechnet) im Gewichte von 11,6103 erfordert 0,6111 H_2O. An Invertzucker würde demnach entstehen 12,2214 g.

Durch die Vergärung entwickelt sich an Alkohol und Kohlensäure:

	Berechnet:	Gefunden:
C_2H_5OH	6,2465 g	5.4704 g
CO_2	5,9749 „	5,5520 „
	12,2214 g	11,0224 g

Rechnen wir nun die so gewonnenen Analysenresultate von dem benutzten Rübengewichte auf ein Gewicht von 100 g Zuckerrübenwurzel um, so erhalten wir:

Versuch 1. 2,008 g Invertzucker in 100 g Zuckerrübenwurzel liefern:

	Berechnet:	Gefunden:
C_2H_5OH	1,026 g	1,263 g
CO_2	0,981 „	1,000 „
	2,007 g	2,263 g

Versuch 2. 2,027 g Invertzucker in 100 g Zuckerrübenwurzel liefern:

Berechnet:		Gefunden:
C_2H_5OH	1,036 g	0,790 g
CO_2	0,991 „	0,776 „
	2,027 g	1,566 g

Versuch 3. 2,225 g Invertzucker in 100 g Zuckerrübenwurzel liefern:

Berechnet:		Gefunden:
C_2H_5OH	1,138 g	1,324 g
CO_2	1,088 „	1,344 „
	2,226 g	2,668 g

Aus den analytischen Resultaten ist ersichtlich, dafs der Verlust an Saccharose nahezu identisch ist mit dem Verluste an Trockensubstanz. Die Differenz beträgt:

in Versuch 1 . . . . 0,9291 g
„ „ 2 . . . . 0,6716 „
„ „ 3 . . . . 2,8768 „

Bei den ersten zwei Experimenten ergiebt sich eine sehr günstige Übereinstimmung. Bei dem dritten Versuche nehmen wir eine bedeutende Differenz wahr, welche durch die gefundene geringere Quantität an Saccharose verschuldet erscheint.

Dafs thatsächlich ein analytischer Fehler bei der Bestimmung der Saccharose diese bedeutende Differenz zwischen Zuckerverlust und Abnahme der Trockensubstanz verschuldet hat, beweist uns die aufgefundene auf die Saccharose umgerechnete Alkohol- und Kohlendioxydmenge. Der Verlust der Saccharose beträgt im Hinblick auf die gefundene Menge Alkohol und Kohlendioxyd 10,47 g. Der Verlust an Trockensubstanz beträgt 11,6103 g, der Unterschied ergiebt sich mit 1,1403 g, also ein ziemlich günstiges Resultat.

Reduzieren wir die oben vermerkte Differenz auf 100 g Zuckerrübenanfangsgewicht, dann ergeben sich die Differenzen wie folgt:

Beim Versuche 1 mit . . . . 0,26 g
„ „ 2 „ . . . . 0,16 „
„ „ 3 „ . . . . 0,69 „

Ziehen wir weiter die Differenzen in Betracht, welche wir zwischen dem entwickelten Kohlendioxyd und dem Alkohol, umgerechnet auf Saccharose, und dem Verlust der Trockensubstanz finden, dann ergeben sich nachfolgende Ziffern:

Beim Versuche 1 1,6169 g auf ein Rübengewicht von 351,3 g
„ „ 2 1,1814 „ „ „ „ „ 423,9 „
„ „ 3 1,1403 „ „ „ „ „ 413 „

Berechnen wir weiter die Differenzen einerseits zwischen dem gebildeten Alkohol und Kohlendioxyd, umgerechnet auf Saccharose, und andererseits dem thatsächlichen Verluste an Saccharose, so finden wir:

Beim Versuche	1	0,6878 g	auf ein Rübengewicht von	351,3 g
„ „	2	1,8530 „	„ „ „ „	423,9 „
„ „	3	1,7365 „	„ „ „ „	413 „

Aus all den gefundenen Resultaten geht sehr klar hervor, dafs der anaerobe Stoffwechsel der Zuckerrübenwurzel im wesentlichen identisch ist mit der alkoholischen Hefegärung.

So wie bei der alkoholischen Hefegärung als Hauptprodukt Kohlendioxyd und Äthylalkohol entsteht und die Nebenprodukte nur in unbedeutendem Mafse auftreten, so ergeben sich auch bei dem anaeroben Stoffwechsel der Zuckerrübenwurzeln Kohlendioxyd und Äthylalkohol als Hauptprodukte, während Nebenprodukte nur in unbedeutendem Mafse auftreten. Wir finden ferner dasselbe quantitative Verhältnis zwischen Kohlendioxyd und Alkohol wie bei der alkoholischen Hefegärung.

Aus allen diesen Thatsachen ist zu entnehmen, dafs die Saccharose, der in die Zuckerrübenwurzel niedergelegte Reservestoff, in der Zelle zuerst durch Hydrolyse in Hexosen, Glykose und Lävulose übergeht, und dafs diese Hexosen dann durch einen Mechanismus, der der Hefegärung entspricht, in Kohlendioxyd und Äthylalkohol gespalten werden.

6. Über die Invertase der Zuckerrübe.

Es war zu vermuten, dafs die Hydrolyse der Saccharose durch eine Invertase hervorgerufen wird, welche ja thatsächlich in Pflanzenorganismen bereits vielfach nachgewiesen ist. Das Vorkommen derselben aufser bei Saccharomyceten ist sichergestellt bei Pilzen von Hansen, E. Fischer, P. Lindner, Thierfelder, Fernbach, Went u. a., bei den höheren Pflanzen von Kjeldahl, und zwar in keimender Gerste, von Béchamp in den Blumen der Robinia pseudoacacia und viscosa, sowie in Papaver Rhoeas und Rosa centifolia, von Mireau in bedeutender Menge in den Früchten der Banane, von O'Sullivan in den Organen der Graminaceen u. s. w.

Unsere nächste Aufgabe war es, nachzuweisen, ob sich thatsächlich Invertase in den Zellen der Zuckerrübenwurzel nach durchgeführtem anaeroben Stoffwechselversuch vorfindet.

Invertzucker konnte stets in der Lösung in bedeutender Menge nachgewiesen werden. Wir haben nach

Versuch 1 in der Lösung *)	0,9898 g	Invertzucker
„ 2 „ „ „	1,2160 „	„
„ 3 „ „ „	2,5340 „	„

gefunden.

In der Zuckerrübenwurzel wurden ermittelt:

	Vor dem Versuche:	Nach dem Versuche:
Versuch 1	0,059 Proz. Invertzucker	0,148 Proz. Invertzucker
„ 2	0,052 „ „	0,158 „ „
„ 3	0,044 „ „	0,125 „ „

Zum Nachweis der Invertase haben wir die bekannten Methoden angewandt **).

Isolierung der Invertase. Die vorerst in einer 0,5 proz. Sublimatlösung sterilisierte Zuckerrübenwurzel im Gewichte von 10 kg wurde in sterilisiertem Wasser unter Wasserstoffatmosphäre durch 14 Tage anaerob sich selbst überlassen. Nach dieser Zeit wurde die Rübe herausgenommen, abgespült und zu einem feinen Brei zerrieben, welcher sodann mittels hydraulischer Presse ausgepreſst wurde. Der Druck wurde allmählich bis auf 50 Atmosphären erhöht. Zu dem so erhaltenen Preſssafte wurde absoluter Alkohol hinzugesetzt, bis der Alkoholgehalt 60 Proz. betrug. Die Flüssigkeit samt dem ausgeschiedenen Niederschlag wurde zwei Stunden ruhig stehen gelassen, hierauf der Niederschlag abfiltriert, mit absolutem Alkohol durchgewaschen und im Vakuumtrockenapparat getrocknet. Die trockene Masse wurde sodann mit drei Teilen Chloroformwasser gemischt, durch 24 Stunden maceriert und der so entstandene Brei durch Leinwand durchgeseiht.

20 ccm der trüben Flüssigkeit, in welcher die Invertase zu vermuten war, wurden zunächst mit 100 ccm 5 proz. Saccharoselösung gemischt und auf ihren Polarisationswert in der Weise untersucht, daſs 30 ccm mit 1 ccm basischen Bleiacetats gefällt und das klare Filtrat in einer 10 cm langen Röhre polarisiert wurde. Es wurde thatsächlich binnen 48 Stunden bei einer Temperatur von 30° C. eine Abnahme der Saccharose und Bildung von Invertzucker nachgewiesen. Nach diesem

*) In welche die Rübe versenkt war.

**) Detaillierte Angaben und gleichzeitig Belege aus der Litteratur über die Verbreitung der Invertase im Pflanzenreiche und ihre Isolierung enthalten: Jean Effront, Die Diastasen und ihre Rolle in der Praxis. Leipzig und Wien 1900. — Karl Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1900. — J. Reynolds Green, Die Enzyme. Ins Deutsche übertragen von W. Windisch. Berlin 1901. — O. Emmerling, Die Enzyme. Braunschweig 1901. — E. Duclaux, Traité de Microbiologie. Paris 1898 — 1901. — C. Went, Über den Einfluſs der Nahrung auf die Enzymbildung durch Monilia sitophila. Jahrbücher für wissenschaftliche Botanik. Leipzig 1901. — A. Fernbach, Sur l'invertase ou soucrase de la levure. Ann. de l'Institut Pasteur, t. 4 (1890).

Orientierungsversuche wurde zur quantitativen Bestimmung des durch die Invertase gebildeten Invertzuckers geschritten.

In zwei 100 ccm-Kölbchen wurden je 25 ccm 10 proz. Zuckerlösung und 5 ccm der fraglichen Invertaselösung eingebracht. Eins der Kölbchen wurde, behufs Durchführung eines Kontrollversuchs im Wasserbade durch 30 Minuten erhitzt. Dann wurden in beide 2 Proz. Chloroform hinzugefügt und beide bei 25° C. durch 16 Stunden sich selbst überlassen. Dann wurde ihr Inhalt analysiert. Auf dem Wasserbade wurde vor allem das Chloroform ausgetrieben, dann die Lösung gefällt, filtriert und das klare Filtrat auf 100 ccm verdünnt. 25 ccm reduzierten aus 50 ccm Fehlingscher Lösung an Kupfer:

Von der gekochten Flüssigkeit . . . . . 0,0122 g Kupfer
Von der nicht gekochten Flüssigkeit . . . 0,1014 „ „

Das ist eine neunmal so grofse Menge.

Nachweis der Invertase im Prefssafte der Zuckerrübe, welcher nach Ablauf einer anaeroben Stoffwechselperiode unter einem Drucke von 350 Atmosphären gewonnen wurde.

Aus 5 Litern des Prefssaftes wurde mittels absoluten Alkohols ein Niederschlag erhalten, der mit 90 proz. Alkohol schnell gewaschen, im Vakuumtrockenapparat getrocknet und noch warm in 100 ccm sterilen Wassers gebracht wurde. Die Lösung wurde in zwei Teile zu 50 ccm geteilt. Der erste Teil wurde sofort mit 100 ccm sterilisierter 5 proz. Saccharoselösung gemengt. Die zweite Portion wurde durch 10 Stunden bei einer Temperatur von 100° C. erwärmt und dann ebenfalls mit 100 ccm sterilisierter 5 proz. Saccharoselösung gemengt. Beide Kolben wurden im Thermostaten bei einer Temperatur von 25° C. belassen. Nach 24 Stunden zeigte bereits der Kolben, in welchem sich die nicht erwärmte Niederschlagslösung befand, eine deutliche Reduktion der Fehlingschen Lösung, während der zweite eine sehr unbedeutende Reduktion hervorbrachte. Die Lösung im ersten Kolben gab mit essigsaurem Phenylhydrazin einen Niederschlag von Glykosazon, während der zweite Kolben nur eine sehr schwache Reaktion gab.

Durch diesen Versuch war somit die Anwesenheit der Invertase dargethan.

6. Die Zymase der Zuckerrübe.

Es ist nun fünf Jahre her, dafs Eduard Buchner die Möglichkeit einer alkoholischen Gärung ohne Hefezelle darthat. Seine Angabe wurde jedoch einerseits von vielen Seiten, insbesondere von Stavenhagen, bestritten, andererseits wurde ihm die Priorität abgesprochen*). Jetzt vermag man die Bedeutung von Buchners

*) M. Herzog bemerkt in seiner letzthin publizierten Arbeit: „Liefert das Pankreas ein Dextrose spaltendes, Alkohol und Kohlensäure bildendes Enzym?“, dafs er schon im Jahre 1894 mit aller Bestimmtheit die Ansicht vertrat, dafs die Zuckerspaltung durch Hefezellen die Funktion eines Enzyms sein müsse. (S. Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. 2, Heft 1 bis 2 (1902.)

folgenreicher Entdeckung für die Auffassung der Dissimilationsprozesse im ganzen Pflanzenreiche klarer zu übersehen. Delbrück*), Will**), Lange***), Wrobléwski†), Albert††) und Mazé†††) haben die Zymase aus der Hefezelle, wie auch aus einzelnen Pilzen (Mazé) isoliert und die Beobachtungen Buchners vollständig bestätigt. Wrobléwski charakterisiert die Zymase mit folgenden Worten: „Ungeachtet dessen, daſs es noch nicht streng bewiesen ist, daſs Zymase mit dem Protoplasma nicht verbunden ist, sprechen schon ihre bekannten Eigenschaften dafür, daſs sie von den Enzymen verschieden ist und denselben daher nicht eingereiht werden kann. Sie ist zwar ein Ferment, aber kein Enzym. Sie repräsentiert eine dritte Gruppe der Katalysatoren, welche sehr nahe den morphologischen Bestandteilen des Protoplasmas stehen."

Nach neueren Untersuchungen kann man aber nicht mehr bezweifeln, daſs die Buchnersche Zymase wirklich ein echtes Enzym ist. Bei den vorliegenden Studien über die anaerobe Atmung der Pflanzen haben wir gefunden, daſs nicht nur die Wurzeln der Zuckerrübe, sondern auch die Knollen der Kartoffeln, Früchte wie Citronen, Äpfel, Birnen, weiter die Samen der Getreidearten u. s. w. nach einer Periode sowohl anaeroben als auch aeroben Stoffwechsels ein der Buchnerschen Zymase ähnliches Enzym enthalten. Wir haben dabei weiter feststellen können, daſs das Gärungsvermögen einzelner Pflanzenteile, besonders aber der Früchte bezw. einzelner Samen sehr verschieden ist und zwar, wie es scheint, von dem Verhältnisse der Eiweiſsstoffe zu den Hexosen, Disacchariden und Polysacchariden, welche in den einzelnen Pflanzenbestandteilen enthalten sind, abhängt.

Auch die Nitratgärung *†) der Denitrifikationsbakterien ist nur

---

*) Delbrück, Alkoholische Gärung ohne Hefezellen. Wochenschrift für Brauerei **14**, 363; **15**, 133.

) Will, Zur Frage der alkoholischen Gärung ohne Hefezellen. Zeitschrift für das ges. Brauwesen **20, 363; **21**, 291.

***) Lange, Beitrag zur alkoholischen Gärung ohne Hefezellen. Wochenschrift für Brauerei **15**, 877.

†) Wrobléwski, Über den Buchnerschen Hefepreſssaft. Journal für praktische Chemie **64**, 1.

††) Albert, Einfacher Versuch zur Veranschaulichung der Zymasewirkung. Berliner Berichte **33**, 3775 (1901).

†††) Mazé, Die Zymase von Eurotiopsis Garzoni. Compt. rend. 135.

*†) Wir verweisen auf den Vortrag Julius Stoklasas gelegentlich der Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Hamburg 1901: Über die Nitratgärung und ihre Bedeutung in den biologischen Prozessen des Bodens. Chemikerzeitung 1901, Zentralblatt für Bakteriologie 1901 u. s. w.

hervorgerufen durch die Anwesenheit eines der Zymase ähnlichen Enzyms in der Zelle dieser Bakterien. Der Äthylalkohol, dessen Quantum abhängig ist von der Gärungsenergie der Bakterien in den verschiedenen Nährmedien, wirkt auf zwei Moleküle salpetriger Säure nach der Gleichung:

$$C_2H_5OH + 2N_2O_3 = 2CO_2 + 4N + 3H_2O.$$

Zahlreiche Bakterien reduzieren die Nitrate im Nährmedium durch den Wasserstoff in statu nascendi in Nitrite, welche dann durch die Einwirkung des Alkohols zu elementarem Stickstoff reduziert werden.

Buchner*) und Wroblέwski**) beobachteten, dafs bei der alkoholischen Gärung der Hefezelle die Nitrite zu elementarem Stickstoff reduziert werden, und erklärten, dafs Hefesaft denitrifizierend wirke. Beide Forscher vermuten, dafs die Reduktion der Nitrite, bezw. der salpetrigen Säure darauf beruht, dafs die Ammonsalze, primären Amine und Amide mit den Nitriten, bezw. mit der salpetrigen Säure freien Stickstoff entwickeln, wie Marpmann***) nachzuweisen versucht. Bereits an mehreren Stellen haben wir darauf hingewiesen †), dafs bei der Konzentration, bei welcher die Denitrifikationsprozesse vor sich gehen, diese Reaktion nicht eintritt. Wenn z. B. eine Nährlösung in 1000 ccm 2 bis 4 g Ammoniumnitrat neben einigen Disacchariden oder einigen organischen Säuren (in vollständig neutralem Zustande) und den übrigen anorganischen Nährstoffen enthält, so vergärt der Bacillus Hartlebii die Saccharose, Maltose u. s. w., das Ammonnitrat wird zu Ammoniumnitrit und schliefslich die salpetrige Säure bis zu elementarem Stickstoff reduziert, ohne dafs die ursprünglich vorhandene Quantität Ammoniak, welche wir an Milchsäure, Buttersäure gebunden finden, eine Änderung erfährt.

Die Gegenwart des der Zymase ähnlichen Enzyms im Safte der Zuckerrübe nach Ablauf einer Periode anaeroben Stoffwechsels bezw. dem dadurch eingeleiteten intensiven Gärungsprozesse nachzuweisen, gelang mittels verschiedener Methoden.

---

*) Buchner und Rapp, Berliner Berichte 34, 1523 (1901).

**) Wroblέwski, Über den Buchnerschen Hefesaft. Journal für praktische Chemie 1901.

***) Marpmann, Zentralblatt für Bakteriologie 1899.

†) Julius Stoklasa und Eugen Vítek, Stickstoffassimilation durch die lebende Bakterienzelle. Zentralblatt für Bakteriologie 1901. Julius Stoklasa, Über den Einflufs der Bakterien auf die Zersetzung der Knochensubstanz. Diese Beiträge 3, 322 (1902).

Isolierung der Zymase. Macfadyen, Morris und Rowland beobachteten eine starke Selbstgärung des Hefesaftes unter Bildung von Kohlendioxyd und Alkohol. Auch wir beobachteten Entwickelung von CO_2 im Zuckerrübensaft, den wir durch Druck von 100 bis 400 Atmosphären nach erfolgter anaerober Atmung erhalten hatten, nachdem wir 2 g Kaliummetaarsenit auf 100 ccm Saft zugefügt hatten. Die Gärungsthätigkeit des Saftes war stärker, sobald dem Safte bei einer Temperatur von 25° C. Glykose, und zwar auf 100 ccm 5 g hinzugefügt wurde. Diese Erscheinung führte uns zum Studium der Selbstgärung des Saftes aus der Zuckerrübe nach Ablauf einer Periode anaerober Atmung.

Erste Versuchsreihe.

Etwa 10 kg Zuckerrübenwurzel, sterilisiert in 0,5 proz. Sublimatlösung, wurden in sterilisiertem Wasser belassen und häufig die über der Flüssigkeitssäule in dem geschlossenen Gefäſse befindliche Wasserstoffatmosphäre erneuert. Letzteres geschah, weil nach 24 Stunden die Gärung bereits ziemlich intensiv auftrat und sich unter heftiger Schaumbildung steigerte. Nach 14 Tagen wurden die Rüben zerrieben und der Brei einem Drucke von 100 Atmosphären unterworfen und der ausgepreſste Saft für sich aufgefangen. Der Preſsrückstand wurde neuerlich einem Drucke von 400 Atmosphären ausgesetzt, der Saft abermals aufgefangen. Zu dem hinreichend (durch Leinwand) filtrierten Safte, welcher in Portionen zu 500 ccm in zwei sterilisierte Cylinder gethan wurde, wurden 10 g Kaliummetaarsenit (nach Buchner) hinzugefügt. Die Armatur der Cylinder war in derselben Weise angeordnet, wie dies früher betreffs der Anordnung der Versuche mit anaerober Atmung beschrieben wurde. Durch die Cylinder wurde Wasserstoff täglich durchgetrieben und gleichzeitig das Kohlendioxyd in bekannter Weise bestimmt.

Die Temperatur wurde auf 20 bis 22° C. gehalten. Die Menge des aus dem Preſssafte entwickelten Kohlendioxyds war folgende:

	Preſssaft gewonnen bei 100 Atmosphären	Preſssaft gewonnen bei 400 Atmosphären
1. Tag	0,0320 g	0,0000 g
2. „	0,0304 „	0,0478 „
3. „	0,0270 „	0,0151 „
4. „	0,0050 „	0,0055 „
5. „	0,0231 „	0,0269 „
6. „	0,0496 „	0,0093 „
Summe des CO_2	0,1671 g	0,1046 g
In der Lösung wurden gefunden CO_2	0,1116 g	
	0,2787 g	
Im Zuckerrübensafte vor dem Versuche gefunden CO_2	0,1000 g	
Ausgeschiedenes CO_2	0,1787 g	

Alkohol in dem bei etwa 100 Atmosphären erhaltenen Prefssaft:

Vor dem Versuche waren 1,5494 g Alkohol in 500 ccm enthalten
Nach „ „ „ 1,6692 „ „ „ 500 „ „
Zuwachs . . . . 0,1198 g Alkohol.

Im zweiten Versuche wurde der in der Lösung befindliche Alkohol sowie das Kohlendioxyd nach dem Versuche nicht bestimmt.

Aus den mitgeteilten Resultaten geht hervor, dafs die Gärkraft des bis zu einem Druck von 100 Atmosphären, sowie bis zu einem Druck von 400 Atmosphären erhaltenen Prefssaftes annähernd gleich ist. Innerhalb 6 Tagen wurden in der Wasserstoffatmosphäre von ersterem 0,1671 g Kohlendioxyd, von letzterem 0,1046 g gasförmig abgegeben. In der Lösung wurden im ersten Falle nach dem Versuche noch 0,1116 g Kohlendioxyd, daher mit der ausgeschiedenen Menge im ganzen 0,2787 g gefunden. Im Safte wurde vor dem Versuche 0,1 g Kohlendioxyd gefunden. Es beträgt demnach die Menge des gebildeten Kohlendioxyds 0,1787 g. Was den Alkohol betrifft, so wurden gefunden nach dem Versuche 1,6692 g, vor dem Versuche 1,5494 g. Es zeigt sich daher ein Zuwachs von 0,1198 g Alkohol. In 500 ccm Prefssaft waren vor dem Versuche an Saccharose und Invertzucker, beides berechnet auf Glykose, 46,2 g enthalten. Wie wir uns überzeugt haben, war der Saft **zellenfrei** und selbst nach dem Versuche in den Cylindern, wie wir uns durch Plattengufs versicherten, auch **bakterienfrei.**

Der Gärungsprozefs war bereits am zweiten Tage bemerkbar. Die Resultate des Experimentes waren aber nicht völlig entsprechend, und deshalb veranstalteten wir ein zweites Experiment, dessen Verlauf in folgendem wiedergegeben ist.

Zweite Versuchsreihe.

Unter den oben angeführten Bedingungen wurde abermals der Prefssaft nach Beendigung des Versuches mit anaerober Atmung aus einer gröfseren Menge Zuckerrübenwurzeln dargestellt und gut durchgerührt. In einer Probe wurde das Kohlendioxyd und der Alkohol bestimmt. Der übrige, von allen zelligen Elementen vollständig befreite Saft wurde zu je 500 ccm (516 g) in drei sterilisierte, mit vollständiger Armatur versehene Cylinder verteilt.

In Cylinder I wurde auf 500 ccm 0,053 g Sublimat
„ „ II „ „ 500 „ 5,16 „ Toluol
„ „ III „ „ 500 „ 10 „ Kaliummetaarsenit

zugefügt.

Bei einer Temperatur von 18 bis 20° C. und unter stetem Hindurchleiten von kohlendioxydfreier Luft, und zwar 5 Liter pro Stunde, wurden pro 24 Stunden die folgenden Kohlendioxydmengen gefunden:

Tag	Prefssaft versetzt mit Sublimat	mit Toluol	mit Kaliummetaarsenit
1.	0,0311 g	0,0250 g	0,0300 g
2.	0,0086 „	0,0123 „	0,0335 „
3.	0,0069 „	0,0156 „	0,0223 „
4.	0,0111 „	0,0107 „	0,0138 „
5.	0,0133 „	0,0164 „	0,0192 „
6.	0,0118 „	0,0137 „	0,0189 „
7.	0,0093 „	0,0235 „	0,0134 „
8.	0,0153 „	0,0187 „	0,0239 „
9.	0,0245 „	0,0157 „	0,0164 „
10.	0,0306 „	0,0104 „	0,0111 „
11.	0,0305 „	— „	0,0100 „
12.	0,0311 „	— „	0,0175 „
13.	0,0297 „	— „	0,0245 „
14.	0,0233 „	— „	0,0269 „
	Summe in 14 Tagen 0,2771 g CO_2,	innerhalb 10 Tagen 0,1620 g CO_2	innerhalb 14 Tagen 0,2814 g CO_2

Nach dem Versuche im Prefssafte gefundenes Kohlendioxyd. (Nach Abzug des schon im Safte enthaltenen Kohlendioxyds):

I. In der mit Sublimat versetzten Probe . . . 0,2106 g
II. „ „ „ Toluol „ „ . . . 0,1484 „
III. „ „ „ Kaliummetaarsenit „ „ . . . 0,2730 „

An Kohlendioxyd wurde somit im ganzen gebildet:

I. In der mit Sublimat versetzten Probe . . . 0,4877 g
II. „ „ „ Toluol „ „ . . . 0,3104 „
III. „ „ „ Kaliummetaarsenit „ „ . . . 0,5544 „

In 500 ccm Saft wurden vor dem Versuche an Alkohol gefunden . . . . 0,6240 g

Nach dem Versuche wurde im Prefssafte an Alkohol gefunden:

I. In der mit Sublimat versetzten Probe . . . 2,1634 g
II. „ „ „ Toluol „ „ . . . unbestimmt
III. „ „ „ Kaliummetaarsenit „ „ . . . 1,1214 g

Daher an entstandenem Alkohol und Kohlendioxyd:

	CO_2	$C_2H_5.OH$
I. In der mit Sublimat versetzten Probe	0,4877 g	1,5394 g
II. „ „ „ Toluol „ „	0,3104 „	nicht bestimmt
II. „ „ „ Kaliummetaarsenit „ „	0,5544 „	0,4974 g

Wir haben weiter Versuche mit dem von uns in der oben beschriebenen Weise gewonnenen Prefssafte unter Hinzufügung von Glykose durchgeführt. Dieselben können jedoch wegen

eines unterlaufenen Fehlers nicht als völlig beweiskräftig gelten, so dafs wir dermalen von ihrer Mitteilung absehen.

Aus den angeführten Beobachtungen über die Gärthätigkeit des Saftes der Zuckerrübenwurzel ist zu ersehen, dafs derselbe Kohlendioxyd und Alkohol in ziemlich bedeutender Menge auch unter allen Kautelen der Asepsis bildet. Die Gärung war eine sehr mäfsige, die Schaumbildung zeigte sich an der Oberfläche der Flüssigkeit in geringer, gleichmäfsiger Menge. Innerhalb etwa 14 Tagen sank immer die Menge des täglich produzierten Kohlendioxyds plötzlich auf einige Milligramm herab, der Prozefs war beendet.

Vergleichen wir die Intensität der Kohlendioxydproduktion im Prefssafte mit der Atmung der gesunden Zuckerrübe, so bemerken wir nachfolgende Unterschiede: Bei einer Temperatur von 18 bis 20° C. wurden von der Zuckerrübenwurzel im Gewichte von etwa 500 g innerhalb einer Stunde 5 bis 6 mg Kohlendioxyd ausgeschieden, während 516 g Prefssaft 1,4 bis 1,6 mg Kohlendioxyds produzierten. Hierzu mufs jedoch bemerkt werden, dafs der benutzte Prefssaft in seiner Konzentration nicht dem frischen Zuckerrübensaft entsprach, sondern fast auf die Hälfte mit Wasser verdünnt war, denn die Rüben waren bei der anaeroben Atmung 10 bis 14 Tage in Wasser versenkt gewesen. Selbstverständlich war bei diesem Vorgang ein Teil des Zuckers vergoren, ein anderer ausgelaugt worden. Wir können daher vermuten, dafs bei entsprechender Konzentration die Gärthätigkeit des Saftes jener der Zuckerrübenwurzeln ziemlich nahe gekommen wäre.

Es ist denkbar und wahrscheinlich, dafs die Gärung in der Zuckerrübenzelle dadurch auf der gleichen Intensität erhalten wird, dafs sich ständig neue Zymase bildet, während bei der zellenfreien Gärung nur jene Menge Zymase wirksam ist, welche in die Lösung gelangt. Es liegt auf der Hand, dafs infolge der Verletzung des lebenden Protoplasmas die Sekretion der Zymase vollständig aufgehört hat, und hierin liegt der grofse Unterschied zwischen der Gärung des Prefssaftes und der Zelle selbst.

Wir möchten noch ausdrücklich erwähnen, dafs sämtliche Versuche über Gärung des Saftes bei völligem Ausschlusse von Mikroben erfolgten. Wehmer*) bemerkt zwar, dafs eine 2 proz. Kaliummetaarsenit-

*) K. Wehmer, Über Hemmungs- und Giftwert einiger Substanzen für Hefe. Zeitschrift für Spiritusindustrie 1901, Nr. 25.

lösung kein völlig verläſsliches Antiseptikum darstelle, nichtsdestoweniger bemerke ich, daſs wir bloſs in drei Fällen ein schwaches Wachstum von Hyphomyceten und Bakterien konstatieren konnten, welche Fälle aus unseren Beobachtungen ausgeschlossen wurden.

8. Gärung des Zuckerrübenwurzelsaftes nach Filtration durch das Chamberlandfilter.

Buchner, Macfadyen, Morris und Rowland machten darauf aufmerksam, daſs Hefesaft, welcher durch das Chamberlandfilter filtriert wird, das spontane Gärvermögen einbüſst. Wroblewski hat sogar gefunden, daſs derart filtrierter Saft die Fähigkeit verliert, Zucker in Gärung zu versetzen.

Der in oben beschriebener Weise unter einem Drucke von 400 Atmosphären erhaltene Preſssaft wurde gründlich durchgerührt und in drei Portionen à 1000 ccm geteilt. Eine Portion wurde durch sterilisierten Sand, die zweite durch das Chamberlandfilter filtriert, die dritte zu Kontrollzwecken auf Selbstgärung geprüft.

Zu jeder Probe wurden 500 ccm verwendet und die täglich bei 23 bis 25° C. produzierte Kohlendioxydmenge bestimmt.

Der Flüssigkeit in jedem Versuchscylinder wurden 10 g Kaliummetaarsenit zugefügt. Täglich wurde ein Luftstrom von 5 l pro Stunde, eine Stunde lang, durch die Flüssigkeit hindurchgetrieben.

In Stunden	Der Saft bildete CO_2 nach Filtration durch Chamberland	durch sterilis. Sand	in der Kontrollprobe
24	0,032 g	0,052 g	0,068 g
48	0,033 „	0,041 „	0,094 „
96	0,022 „	0,020 „	0,073 „
120	0,014 „	0,058 „	0,028 „
144	0,013 „	0,047 „	0,034 „
Summe in 5 Tagen	0,114 g CO_2	0,218 g	0,297 g

Aus dieser Tabelle ersehen wir, daſs im ersten Falle, wo der Saft durch das Chamberlandfilter filtriert wurde, dieser im ganzen 0,114 g Kohlendioxyd lieferte, der durch sterilisierten Sand filtrierte 0,218 g, der einfach durch Leinwand gepreſste im ganzen 0,297 g. In den letzten beiden Fällen wurde eine ziemlich mäſsige Gärung beobachtet. Nach dem Versuche konnte die Gegenwart von Mikroben nicht beobachtet werden.

Es ist bekannt, daſs die Zymase sehr schwer dialysiert und zum groſsen Teile im Chamberlandfilter zurückgehalten wird. Dasselbe gilt von unserem gärungserregenden Agens. Ja wir be-

obachteten, dafs schon durch Sand die Gärkraft des Saftes einigermafsen abgeschwächt erscheint.

Bei sämtlichen Versuchen sahen wir, dafs bei der anaeroben Atmung aus der Zuckerrübenwurzel reichlich Kohlendioxyd in Bläschen austrat. Die klare Lösung, in welche die Rüben versenkt waren, zeigte aber nach dem Versuche bei Gegenwart von antiseptischen Mitteln, und zwar von Kaliummetaarsenit, Sublimat, Thymol oder Toluol niemals Gärung. Die Abgabe von Kohlendioxyd war stets eine so minimale, dafs von einer Gärthätigkeit überhaupt nicht gesprochen werden kann.

Auf Grund dieser Resultate ist sicherlich der Schlufs gestattet, dafs der anaerobe Gärprozefs sich vollständig innerhalb der Rübenzelle vollzieht. Diese Anschauung erscheint überdies auch dadurch gestützt, dafs es uns nicht gelang, in der Flüssigkeit, in welcher die Zuckerrübenwurzel gor, ein der Zymase ähnliches Enzym nachzuweisen. Die Rübenzymase hat somit durch die Zellmembran nicht diffundiert. Wie die Hefezymase, so ist auch unser, derselben analoges Enzym, wie es scheint, ein kolloidaler, in Wasser wenig löslicher Körper. Die Hydrolyse der Saccharose und die exothermale Spaltung der Kohlehydrate ist somit ein rein intracellularer Vorgang. Erst wenn die Zellwand eine Zerstörung erfahren hat, ist es möglich, aus der Zelle das der Zymase ähnliche Enzym zu erhalten. Die intracellulare Atmung der Zuckerrübenwurzel ist eine Invertierung der Saccharose mit nachfolgender Vergärung.

9. Weitere Versuche zur Isolierung der Rübenzymase.

Versuch 1. Zur weiteren Isolierung des der Zymase analogen Enzyms benutzten wir eine Modifikation der Albert-Buchnerschen*) Methode, von deren Genauigkeit wir uns vorher bei verschiedenen Mikrobenarten überzeugt hatten.

Dem nach Ablauf des Versuchs mit anaerober Atmung unter einem Drucke von 300 Atmosphären gewonnenen Prefssaft wurde in einem hohen, engen Cylinder absoluter Alkohol und Äther hinzugefügt. Nach Abscheidung des dunkeln, hauptsächlich aus Eiweifskörpern bestehenden Niederschlages, die in einigen Minuten erfolgte, wurde die Flüssigkeit über dem Niederschlage sofort abgehebert und der Alkohol durch Äther

*) R. Albert, Einfacher Versuch zur Veranschaulichung der Zymasewirkung. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch., Berlin 1901. — Buchner, Alkoholgärung ohne Hefezellen. Ebenda 1897. — Buchner, Über zellfreie Gärung. Ebenda.



ersetzt. Nach Durchschütteln mit demselben wurde die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit abgezogen, rasch durch ein geräumiges Filter filtriert, sodann der Niederschlag in einem warmen Luftstrom bei etwa 30° C. getrocknet.

Der Niederschlag wurde im Kolben mit 16 proz. Glykoselösung vermischt und zwar wurden auf etwa 6 g des Niederschlages 50 ccm 16 proz. Glykoselösung verwendet. Als Antisepticum wurde der Lösung ein Körnchen Thymol zugefügt, der Kolben ins Wasserbad versenkt und mit einer entsprechenden Einrichtung behufs Bestimmung des Kohlendioxyds versehen. Die Flüssigkeit begann augenblicklich zu gären. Innerhalb 48 Stunden wurden 0,93 g Kohlendioxyd gebildet.

Das Kohlendioxyd wurde durch Hindurchtreiben von kohlensäurefreier Luft durch die Flüssigkeit erhalten. Zur Abscheidung des gärungserregenden Enzyms waren 2,5 Liter Flüssigkeit benutzt worden. Die Menge des Niederschlages war nur eine geringe, weil man rasch arbeiten und den Niederschlag von Alkohol und Äther durch schnelle Dekantation befreien mufste.

Versuch 2. Es wurde im ganzen in derselben Weise wie im vorigen Versuche vorgegangen. In zwei Kolben wurden je etwa 5 g Niederschlag, welcher das der Zymase ähnliche Enzym enthalten mufste, gebracht. Als Antisepticum wurde wieder Thymol verwendet. Der Inhalt eines der Kolben wurde gründlich aufgekocht. Beide Kolben wurden dann bei einer Temperatur von 28 bis 30° C. unter den schon früher angeführten Kautelen belassen, der Niederschlag wurde mit einer 16 proz. Glykoselösung übergossen und das Kohlendioxyd durch Durchtreiben von kohlendioxydfreier Luft ausgetrieben. Aus dem aufgekochten Kolbeninhalte wurden im Laufe von 72 Stunden 0,006 g Kohlendioxyd gewonnen, während in dem Kolbeninhalte, der nicht aufgekocht worden war, somit das unveränderte Enzym enthielt, 0,332 g Kohlendioxyd gefunden wurden.

Versuch 3. Der Versuch wurde in der oben näher beschriebenen Art wiederholt. Zur Ausscheidung wurden 1,2 Liter Saft benutzt. Der ausgeschiedene Niederschlag wurde in 50 ccm 16 proz. Saccharoselösung gethan und mit Thymol versetzt. Es wurden durch den CO_2-freien Luftstrom innerhalb 78 Stunden bei einer Temperatur von 30° C. 0,4938 g Kohlendioxyd ausgetrieben.

Versuch 4. Der Versuch wurde ganz genau unter den früheren Verhältnissen durchgeführt, es wurden ungefähr 6 g des Niederschlages in 100 ccm 16 proz. Glykoselösung gebracht. Es trat sofort energische Gärung ein. Binnen 2 Stunden wurde mittels Luftdurchleiten 0,15 g Kohlendioxyd erhalten.

Versuch 5. Gewonnen wurden an Niederschlag etwa 7 g, die mit 100 ccm 15 proz. Glykoselösung gemischt wurden. Der Mischung wurde 1,0 g Kaliummetaarsenit hinzugefügt. Die Temperatur wurde zwischen 29 und 30° C. gehalten. Es wurden mittels Luftdurchleiten in 84 Stunden 0,9715 g CO_2 erhalten. In der Lösung wurden 0,95 g Alkohol gefunden.

Versuch 6. 6 g Niederschlag wurden mit 100 ccm einer 15 proz. Glykoselösung vermischt. Es trat augenblicklich Gärung unter Kohlendioxydentwickelung ein. Bei 30° C. wurden innerhalb 48 Stunden im ganzen gewonnen:

Kohlendioxyd	**0,635** g
$C_2H_5.OH$	**0,940** „

Das Kohlendioxyd wurde durch kohlendioxydfreie Luft ausgetrieben und auch in einem abgemessenen Teile der Lösung bestimmt.

Versuch 7. Etwa 6 g Niederschlag wurden mit 100 ccm 15 proz. Fruktoselösung gemischt. Es wurde nur eine eben wahrnehmbare Gärung erzielt. Bei 30° C. wurden in 48 Stunden im ganzen gefunden:

CO_2	0,49 g
$C_2H_5.OH$	0,53 „

(Das Kohlendioxyd wurde abermals durch kohlendioxydfreie Luft ausgetrieben und im abgemessenen Teile auch in der Lösung bestimmt.)

Die Resultate dieser Beobachtungen lehren, dafs hier ein chemischer Prozefs vorliegt, bei dem Alkohol und Kohlendioxyd durch ein Enzym gebildet werden.

Was die Vergärbarkeit der einzelnen Kohlehydrate durch die von uns isolierten Enzyme betrifft, so ist zu ersehen, dafs der d-Glukose der Vorzug vor der d-Fruktose zufällt. Die Saccharose wird erst nach vorhergehender Inversion durch die im Niederschlage enthaltene Invertase vergoren.

Dafs die Fruktose wie die Glykose vergärt, das hat uns bereits die Probe, die wir beim Chemismus der Atmung durchgeführt haben, gelehrt. Es schien interessant, festzustellen, ob nicht der Invertzucker, welcher sich nach vollzogenem Anaerobioseversuch findet, vielleicht zum grofsen Teile aus Fruktose besteht.

Wir gingen nach der neuen Methode von Neuberg*) vor, mittels welcher durch Methylphenylhydrazin bei Gegenwart von 50 proz. Essigsäure und Bildung des d-Fruktosemethylphenylosazons ($C_{12}H_{26}O_4N_4$) die Isolierung der Ketose neben Aldose ausgezeichnet möglich ist. Ein auffällig gröfseres Quantum der Fruktose neben Glykose haben wir dabei nicht beobachtet.

Wir erwähnen ausdrücklich, dafs wir den chemisch-biologischen Charakter des der Zymase ähnlichen Enzyms weiterstudieren, namentlich handelt es sich uns um die Isolierung desselben in völlig reinem Zustande.

---

*) Neuberg, Über die Isolierung von Ketosen. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. 35, 959.

Bereits heute halten wir uns für berechtigt, auf Grund der gesamten Beobachtungen und da die Reaktion bei der Vermischung des isolierten Enzyms mit Glykose eine so energische war, mit voller Sicherheit zu schliefsen, dafs es uns gelungen ist, das der Zymase ähnliche Enzym, die Rübenzymase, zu isolieren und seine Wirkungen festzustellen. (Ich verweise übrigens auf meine, im nächsten Hefte erscheinende Arbeit, in welcher über die Isolierung analoger Enzyme nicht nur aus anderen Pflanzenorganen, sondern auch aus Tierorganen berichtet werden wird.)

10. Schlufsbetrachtungen.

Wir hoffen, dafs es uns durch das Mitgeteilte gelungen ist, mit voller Bestimmtheit nachzuweisen, dafs die anaerobe Atmung der Zuckerrübe bei völligem Ausschlufs von Mikroben eine alkoholische Gärung darstellt und dafs die entstandenen Produkte, Alkohol und Kohlendioxyd, echte Exkrete und zwar, in unserem Falle, der Zelle der Zuckerrübenwurzel sind.

Da es uns weiter gelang, die Gegenwart von Enzymen, und zwar einer Invertase und eines der Zymase ähnlichen Enzyms in der Zelle der Zuckerrübenwurzel nachzuweisen, so liegt es auf der Hand, dafs die anaerobe Atmung des Zuckerrübenwurzelorganismus aufserordentlich viel Gemeinsames mit der Atmung der Hefezelle hat. Unsere Erfahrungen weisen darauf hin, dafs die beiden Enzyme, und zwar ebenso die Invertase wie das von uns gefundene, der Zymase analoge Enzym, bei völligem Luftabschlufs sich gebildet haben, und es ist die Möglichkeit anzunehmen, dafs die Rübenzelle nur soviel an dem der Zymase analogen Enzym produziert als sie für ihre Lebensvorgänge braucht. Vergleichen wir nämlich das Gärungsvermögen des zellfreien Zuckerrübenwurzelsaftes unter aseptischen Kautelen mit dem Prefssafte der Hefe in einer 15 proz. Saccharoselösung, so sehen wir, dafs der Hefesaft sich durch eine viel gröfsere Energie in der Abspaltung von Kohlendioxyd und Alkohol auszeichnet. Diese Erscheinung läfst sich sehr leicht daraus erklären, dafs die Gärung, die durch Hefe in einer Saccharoselösung (bei Gegenwart der übrigen notwendigen Nährmedien) hervorgerufen wird, überhaupt eine ungleich energischere ist. Welche Summe von Energie durch die anaerobe Atmung, sowohl der Mikroben als auch der Zuckerrübenwurzel, verfügbar wird, darüber geben die folgenden Beispiele Aufschlufs.

Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 20° C. vorgenommen, und zwar in einer Nährlösung, welche $^1/_{10}$ Molekulargrammgewicht Saccharose und $^1/_{10}$ Molekulargrammgewicht $NaNO_3$ in 1000 ccm Wasser neben den übrigen anorganischen Nährstoffen enthielt.

100 g Clostridium butyricum *) (auf Trockensubstanz berechnet) lieferten innerhalb 1 Stunde . . . . . 2,13 g CO_2.

100 g Bakterium Hartlebii **) (auf Trockensubstanz berechnet) lieferten innerhalb 1 Stunde . . . . . 2,89 g CO_2.

100 g Zuckerrübenwurzel (auf Trockensubstanz berechnet) lieferten innerhalb 1 Stunde . . . . . 0,006 g CO_2.

Welch' bedeutende Verschiedenheiten! Es ist anzunehmen, dafs das Protoplasma der Mikrobenzellen ein verhältnismäfsig gröfseres Quantum Enzyms secerniert und auch eine gröfsere Energie entwickelt, als das Protoplasma der Zellen der höher organisierten Pflanzen. In der Hefezelle scheint die Zymase angehäuft zu sein, was nach unseren Erfahrungen in der Rübenzelle nicht der Fall ist. Wir müssen weiter erwägen, dafs in den Zellen der Zuckerrübenwurzeln ein Reservestoff in grofser Menge niedergelegt ist — die Saccharose, die Eiweifsstoffe hingegen in geringer Menge vorhanden sind. Vielleicht besteht hier ein Zusammenhang. Es wird vielfach angenommen, dafs die Enzyme in ihrer Zusammensetzung den Eiweifsstoffen sehr nahe stehen, und man glaubt wohl allgemein, dafs die Enzyme als stickstoffhaltige Substanzen aus den Eiweifsstoffen hervorgehen.

Wir behaupten nicht, dafs wir aus dem Safte der Zuckerrübenwurzel ein Enzym isoliert haben, welches mit der Buchnerschen Zymase der Hefezelle identisch ist, aber wir sind berechtigt, auf Grund unserer Experimente den Schlufs zu ziehen, dafs in dem Zuckerrübensafte ein Enzym vorhanden ist, welches mit der Zymase Buchners sehr viel Gemeinsames hat.

Unsere weiteren einschlägigen Versuche sind zwar nicht nach jeder Richtung hin abgeschlossen, aber schon sehr weit vorgeschritten. Insbesondere in Bezug auf die Isolierung der Zymase bei anderen Pflanzenprodukten, nach Ablauf der anaeroben Atmung, haben wir Versuche angestellt, deren Publikation bevorsteht. Jetzt schon geht aus denselben unzweideutig hervor, dafs ein der Zymase ähnliches Enzym nach der Gärung in verschiedenen Früchten und Pflanzenteilen nachweisbar ist.

---

*) Unter Buttersäuregärung, wobei Butylalkohol gebildet wird.

**) Unter Nitratgärung, bei welcher Äthylalkohol gebildet wird. In beiden Mikrobenzellenarten wurde ein gärungserregendes Enzym konstatiert.

Die anaerobe Atmung des Organismus der Zuckerrübenwurzel müssen wir nach dem Gesagten als einen vitalen Vorgang betrachten, welcher hervorgerufen wird durch ein vom Protoplasma trennbares Enzym. Die Lebensenergie, die bei diesem anaerobiotischen Prozesse verfügbar wird, ist ein Produkt der Hydrolyse und der Wanderung des Sauerstoffatoms innerhalb des Moleküls.

Nach erfolgter Hydrolyse des Rohrzuckers zu d-Glykose und d-Fruktose werden diese durch die Wirkung eines gärungserregenden Enzyms weiter gespalten:

$$\begin{array}{l} CH_2OH(CHOH)_4COH \text{ und} \\ CH_2OH(CHOH)_3CO.CH_2OH \text{ geben:} \end{array} \quad \begin{array}{l} CH_2.OH \\ | \\ CH_3 \end{array} \quad CO_2 CO_2 \quad \begin{array}{l} CH_3 \\ | \\ CH_2.OH \end{array}$$

Bei genauerer Erwägung der Lebensvorgänge der Pflanzenzelle erscheint es als wahrscheinlich, dafs die aerobe Atmung eine sekundäre Erscheinung ist; der primäre Vorgang ist die intracellulare Bewegung der Atome im lebenden Molekül, verbunden mit der Umlagerung von Sauerstoff innerhalb des Moleküls. Bei diesem Vorgang, durch welchen die zum Leben nötige kinetische Energie gewonnen wird, spalten sich Kohlendioxyd und Alkohol so ab, dafs in dem lebenden Molekül reduzierte Atomgruppen entstehen, welche zum Sauerstoff eine grofse Affinität haben. Bei Ausschlufs von Luft ist bei der anaeroben Atmung keine Möglichkeit gegeben, die im lebenden Protoplasma reduzierte Atomgruppe — Alkohol — in seinem molekularen Aufbau durch Aufnahme von Sauerstoff zu fesseln, deshalb wird dieser neben Kohlendioxyd ausgeschieden. Bei hinreichendem Zutritte von Sauerstoff, also bei aerober Atmung, wird das gebildete Alkoholmolekül in statu nascendi derart gebunden, dafs es unter der Einwirkung von Sauerstoff (durch Aerooxydasen) zur Bildung neuer Teile des lebenden Protoplasmas benutzt wird, bei welchem Vorgange abermals Kohlendioxyd gebildet wird.

Wir haben oben Gelegenheit gehabt, die Gröfse der Abspaltung von Kohlendioxyd genauer kennen zu lernen; wir haben dabei gesehen, dafs bei der anaeroben Atmung etwa um 50 Proz. weniger Kohlendioxyd produziert wird als bei der normalen Atmung, was beweist, dafs nicht aller Kohlenstoff in den reduzierten Atomgruppen zu Kohlendioxyd oxydiert wird, dafs sich somit ein Teil regeneriert und, wie anzunehmen ist, Material zur Bildung neuer Bestandteile des lebenden Protoplasmas darstellt. Wenn man annimmt, dafs bei der anaeroben Atmung aus einem Molekül Hexose (Glykose oder Fruktose) zwei Moleküle Kohlen-

dioxyd entstehen, so entstehen bei aerober Atmung vier Moleküle Kohlendioxyd. Es ist zu ersehen, dafs zwei Atome Kohlenstoff als neues Material zum Aufbau neuer lebender Materie verwendet werden *).

Aus den früher angeführten Versuchen über die anaerobe Atmung bei Einwirkung supramaximaler Temperaturen ist uns bekannt, welche Intensität die Abspaltung des Kohlendioxyds zu erreichen vermag. Der Vorgang ist jetzt klar, da das von uns isolierte, der Zymase ähnliche Enzym bei 30 bis 35° C. eine energische Gärung der Glukose hervorzurufen im stande ist. Aus unseren Versuchen geht hervor, dafs beim Zusammenbringen des von uns isolierten gärungserregenden Enzyms mit Glykose sofort die Spaltung des Zuckers eintritt und mit Steigerung der Temperatur an Intensität ungemein zunimmt. Wie bekannt, besitzt die Hefezymase, der Einwirkung der Hitze gegenüber, ein gröfseres Widerstandsvermögen als die Zelle, aus der sie stammt.

In vorliegender Studie haben wir die Vorgänge der anaeroben Atmung bei der Zuckerrübe erörtert. In einer folgenden Abhandlung werden wir die Isolierung gärungserregender Enzyme bei anaerober Atmung mehrer anderer Pflanzenorganismen beleuchten, in denen als Atmungsmaterial Stärke, Citronensäure und Öl aufgespeichert sind, uns dann aber den Vorgängen in der Mikrobenzelle und schliefslich in der Zelle des tierischen Organismus zuwenden. Nach den neuesten Resultaten unserer Untersuchungen sind wir im stande, das gärungserregende Enzym auch in der normal atmenden Pflanzen- und Tierzelle nachzuweisen.

Erst nach vollständiger Durchführung dieser Untersuchungen wird es möglich sein, ein klares Bild über die intermediären Stoffwechselvorgänge im Pflanzen- und Tierorganismus zu gewinnen und auch eine Erklärung der obligaten bezw. fakultativen anaeroben Atmung zu finden, welche mit den so verschiedenen Gärungserscheinungen einhergeht.

*) Auch Pfeffer betrachtet den genetischen Zusammenhang zwischen der intramolekularen und normalen Atmung als sichergestellt. Pflanzenphysiologie von W. Pfeffer, Leipzig 1897.

XXVIII.

Bemerkungen über das Ovomukoid.

Von **Leo Langstein**.

(Aus dem physiol.-chem. Institut in Strafsburg.)

Während die koagulablen Eiweifskörper des Eierklars in der jüngsten Zeit eine gründliche Bearbeitung erfahren haben, ist das Ovomukoid seit seiner Entdeckung durch Mörner[2]), Neumeister, Salkowski, der Aufklärung seiner Kohlehydratkomponente durch Seemann[3]) und Zanetti, ein Stiefkind der Forschung geblieben. Eine Arbeit von Carlo Milesi, die den Zweifel aufkommen läfst, ob das Ovomukoid ein im Eierklar präformierter Eiweifsstoff sei, war es, die mich veranlafste, anschliefsend an meine Studie über die gerinnbaren Stoffe des Eierklars, eine erneute Untersuchung des Ovomukoids vorzunehmen. Dieselbe wurde im Sommer vorigen Jahres im Laboratorium von Prof. Hofmeister im wesentlichen fertig gestellt, dann durch ein erneutes Studium der Kohlehydratgruppe zur Zeit meiner Thätigkeit an der medizinischen Klinik in Basel (Vorsteher: Prof. Friedr. Müller) vervollständigt.

In einer Arbeit, betitelt: „Di un corpo fosforato isolato dall' Albume d'uovo presentante i caratteri chimici di un mucoide", berichtet Milesi[4]), dafs es ihm gelungen sei, im Eierklar einen reichlich Phosphor enthaltenden Proteinstoff, der in seinen sonstigen Eigenschaften dem Ovomukoid fast völlig gleich, nach folgender Methodik aufzufinden.

Er versetzte Eierklar mit dem vielfachen Volumen 99 proz. Alkohols, trocknete den gebildeten Niederschlag im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur, pulverisierte ihn fein und extrahierte ihn mit wenig kaltem Wasser. Aus der filtrierten Extraktionsflüssigkeit liefs sich durch Alkohol und Äther eine Masse ausfällen, die sich wie arabisches Gummi verhielt, durch geeignete Behandlung

jedoch leicht als weifses Pulver erhalten werden konnte. Sie war nicht hitzekoagulabel, gab sämtliche Eiweifsreaktionen; es gelang Milesi, durch Erhitzen mit 20 proz. Salzsäure Kohlehydrat abzuspalten.

Die Elementaranalyse ergab ihm folgende Werte:

C: 37,06 H: 7,53 N: 10,29 S: 3,50 P: 1,650 Proz.

Milesi weist auf die Ähnlichkeit dieses Körpers mit dem Ovomukoid hin und wirft die Frage auf, ob Mörner nicht vielleicht den Phosphorgehalt seiner Präparate übersehen habe.

An nach Mörner dargestelltem Ovomukoid — die Methode beruht bekanntlich darauf, dafs die gerinnbaren Stoffe des Eierklars durch Kochen koaguliert werden, und aus dem eingeengten Filtrat das Ovomukoid durch Alkohol gefällt wird — habe ich mich zunächst überzeugen können, dafs darin Phosphor höchstens in Spuren vorhanden ist, die überdies ohne weiteres auf Verunreinigungen zurückgeführt werden können. Es drängte sich mir aber naturgemäfs der Gedanke auf, ob nicht die Art der Darstellung, das Erhitzen auf 100°, die Abspaltung eines an Phosphor reichen Komplexes bedingt, dessen alkoholfällbarer Paarling etwa das Ovomukoid der Autoren darstellt. Um zu einer Entscheidung zu gelangen, habe ich nach der Methode Milesis ein Präparat dargestellt, das durch dreimaliges Umfällen und schliefsliche Dialyse gegen eiskaltes destilliertes Wasser gereinigt wurde. Die Analyse der im Vakuum über Schwefelsäure getrockneten Substanz ergab folgende Werte:

C: 48,82 H: 6,90 N: 12,41 S: 2,19 Proz. P in geringen Spuren.

Die Analysenzahlen eines nach Mörner dargestellten Präparates waren folgende:

C: 48,79 H: 6,96 N: 12,51 S: 2,23 Proz. P in Spuren.

Durch dieses Resultat ist mit voller Sicherheit erwiesen, dafs das Ovomukoid im Eierklar präformiert ist. Das abweichende Resultat Milesis vermag ich nicht zu erklären. Meine Analysenwerte stehen auch in guter Übereinstimmung mit denen Mörners und Zanettis; Mörner fand einen Stickstoffgehalt von 12,68 Proz. und einen Schwefelgehalt von 2,22 Proz. Zanetti, der das Ovomukoid nach Mörner darstellte, fand folgende Werte bei der Analyse desselben:

C: 48,75	H: 6,90	N: 12,46	S: 2,22 Proz.
C: 48,94	H: 6,94		

Es möge an dieser Stelle auch eine Bemerkung über die Farbenreaktionen des Ovomukoids Platz finden. Fast sämtliche

Autoren berichten übereinstimmend, dafs die Reaktion nach Adamkiewicz dem Ovomukoid nicht zukomme — eine Angabe, die auch in Thierfelders „Physiologische Chemie“ übergegangen ist. Bei meinen Präparaten fiel die Reaktion immer positiv aus. Vielleicht ist der negative Befund in manchen Fällen darauf zurückzuführen, dafs der angewandte Eisessig keine Glyoxylsäure enthielt.

Es ist nicht leicht, die Stellung des Ovomukoids im System der Eiweifskörper zu präzisieren. Seinen analytischen Eigenschaften nach verhält es sich wie eine Albumose, auf Grund seiner konstitutionellen Merkmale müssen wir es als ein Glykoproteid bezw. als ein Chondroproteid bezeichnen. Letztere Bezeichnung wäre mit Rücksicht auf eine Beobachtung Zanettis[10]) zu wählen, der angiebt, dafs ein Drittel des Gesamtschwefels durch Kochen mit Salzsäure als Schwefelsäure in kurzer Zeit abgespalten werden kann. Ich habe diese Angabe Zanettis an einem fast aschefreien, durch Dialyse gereinigten Ovomukoid nachgeprüft, ohne sie bestätigen zu können. Erst nach dreimal zwölfstündigem Kochen werden Spuren von Schwefelsäure in Freiheit gesetzt, ein Prozefs, der wohl einer sekundär oxydativen Wirkung des Kochens mit Salzsäure zuzuschreiben ist. Ich habe ferner nach der Methode von F. N. Schulz[8]) feststellen können, dafs von den 2,22 Proz. Schwefel 1,39 bis 1,43 Proz. leicht abspaltbar sind, also nicht viel weniger als drei Viertel des Gesamtschwefels. Da Mörner[3]) gezeigt hat, dafs bei einem entsprechenden Verfahren Cystin und Cystein nur drei Viertel ihres Schwefels als Bleisulfid abgeben, ist wohl die Annahme gerechtfertigt, dafs der gröfste Teil des Schwefels im Mukoid in cystinähnlicher Bindung enthalten ist.

Die Beobachtung Zanettis, die das Vorhandensein einer gepaarten Schwefelsäure im Ovomukoid wahrscheinlich machte, hat mich veranlafst, in diesem Eiweifskörper auf Chondroitinschwefelsäure zu suchen — mit negativem Ergebnis. Es ist dies um so bemerkenswerter, als Levene[1]) angiebt, in gewissen Schleimstoffen, aus denen sich Chitosamin abspalten läfst, Chondroitinschwefelsäure gefunden zu haben. Da es bei neueren Versuchen mit vervollkommneten Methoden nicht gelungen ist, aus Chondroitinschwefelsäure Chitosamin[7]) zu erhalten (so in noch unveröffentlichen Untersuchungen O. Neubauers*) aus dem Laboratorium F. Müllers, sowie zufolge einer Angabe von Neuberg[5]) über gemeinsam mit Orgler ausgeführte Versuche), diese Esterschwefelsäure vielmehr

*) Mit Erlaubnis des Autors mitgeteilt.

andere Kohlehydrate in ihrem Molekül enthält, müssen in den von Levene untersuchten Mucinstoffen mehrere Kohlehydrate präformiert sein. Dadurch ist aber ein konstitutioneller Unterschied gegenüber dem Ovomukoid gegeben, denn am Abbau desselben beteiligt sich, wie ich mittels der von Neuberg und Wolff[6]) ausgearbeiteten Methode nachweisen konnte, nur ein einziges Kohlehydrat, das Chitosamin.

Der Gehalt des Eierklars an Ovomukoid scheint ein ziemlich konstanter zu sein; durch das Liegen der Eier erfährt er auf Grund meiner Erfahrung keine Vermehrung. Seine genetischen Beziehungen zu den koagulablen Stoffen des Eierklars zu verfolgen, wäre von Interesse — besonders im Hinblick auf eine von mir gemachte Beobachtung, dafs es durch Spaltung des krystallisierten Ovalbumins mit verdünntem Alkali gelingt, alkoholfällbare Albumosen zu erhalten, die in ihrem Kohlehydrat- und Schwefelgehalt dem Ovomukoid verwandt sind.

Litteratur.

[1]) Levene, Zeitschr. f. physiol. Chem. **31**, 395.

[2]) C. Th. Mörner, ebenda **18**, 525.

[3]) C. Th. Mörner, ebenda **34**, 207.

[4]) C. Milesi, Bolletino della Società Medico-Chirurgica di Pavia 1898.

[5]) C. Neuberg und Orgler cit. nach Neuberg, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. XXXV, **18**, 4011.

[6]) C. Neuberg u. H. Wolff, Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. XXXIV, **15**, 3480.

[7]) Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. **28**, 355.

[8]) Schulz, F. N., Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 16.

[9]) Seemann, J., Inaug.-Diss., Marburg 1898.

[10]) Zanetti, Annali di Chimica e di Farmacologia XXVI, **12**, 529.

XXIX.

Über die jodbindende Gruppe der Proteinstoffe.

Von **A. Oswald.**

(Aus dem chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik in Zürich.)

1. Über Jodierung von Kasein und Leim.

Wie aus Picks Beobachtungen*) hervorgeht, sind die Proto- und die Heteroalbumose in ihrem Bau wesentlich voneinander verschieden. Die Protalbumose enthält wenig Diaminosäuren, wenig oder gar kein Leucin, kein Glykokoll, wohl aber viel Monaminosäuren und viel tyrosin- und indolliefernde Komplexe. Die Heteroalbumose dagegen ist reich an Diaminosäuren, an Leucin und Glykokoll, enthält aber nur sehr wenig tyrosin- und indolliefernde Gruppen, wohl aber Phenylalanin.

Während die Protalbumose bei der Trypsinverdauung leicht und ganz gespalten wird, so wird die Heteroalbumose durch Trypsin nur schwer und wenn überhaupt, nur durch langdauernde Verdauung über die Peptonstufe hinaus zersetzt. Auch gegen andere Einwirkungen, wie die von Pepsinsalzsäure und Alkali, ist die Heteroalbumose anscheinend resistenter.

Trotz dieser Verschiedenheiten zeigen diese beiden Körper in gewisser anderer Beziehung kein sehr abweichendes Verhalten. So ist, wie ich kürzlich dargethan habe, ihr Jodbindungsvermögen kein auffallend differentes. Der Unterschied beträgt blofs 2 Proz. Jod. In

*) Zur Kenntnis der peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins. *I. Teil.* Zeitschr. f. physiol. Chem. 28, 219 (1899) und II. Teil: Die sogenannten Deuteroalbumosen. Diese Beiträge 2, 481 (1902).

die Protalbumose vermochte ich*) 12,33 Proz. Jod (als Mittel aus zahlreichen Jodierungsversuchen), in die Heteroalbumose 10,27 Proz. Jod einzuführen.

Nach Kühnes alter Darstellung entspräche die Protalbumose vorwiegend der Hemigruppe, die Heteroalbumose der Antigruppe des Eiweifsmoleküls.

Unter den genuinen Proteinkörpern finden sich zwei, welche in ihrem Verhalten grofse Ähnlichkeit mit den erwähnten Albumosen aufweisen, das Kasein und das Glutin. Beide sind kohlehydratfrei. Ersteres liefert bei der Pepsinverdauung nur Protalbumosen und keine Heteroalbumose [Alexander]**). Der Leim zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an basischem Stickstoff, Glykokoll (von letzterem nach E. Fischer***) 16,5 Proz.) und Leucin aus, ferner durch Abwesenheit von tyrosin- und indol- bezw. skatolliefernden Komplexen, während Kasein reich an Monaminosäuren [62 Proz. seines Stickstoffes sind in dieser Form vorhanden]†), an Tyrosin, und arm an Diaminosäuren ist. Kasein ist durch Trypsin leicht, Glutin dagegen schwer verdaulich [Klug††), Chittenden†††), Nencki*†), Tatarinoff*††), Reich-Herzberge*†††)].

Im Hinblick auf diese Ähnlichkeit war es nun von Interesse, zu untersuchen, wie sich Leim und Kasein der Einführung von Jod gegenüber verhalten.

Obgleich schon von verschiedenen Autoren Jod in das Kasein eingeführt wurde und Bestimmungen seines Jodgehaltes vorliegen, so habe ich es dennoch selbst jodiert, um ein sicheres Vergleichsobjekt zu

---

*) Über jodierte Spaltungsprodukte des Eiweifses. Diese Beiträge 3, 391 (1903).

**) Zur Kenntnis des Kaseins und seiner peptischen Spaltungsprodukte. Zeitschr. f. physiol. Chem. 25, 411 (1898).

***) Über die Hydrolyse des Leims. Ebenda 35, 70 (1902).

†) Gümbel, vgl. Hofmeister, Ergebnisse der Physiologie, herausgegeben von Asher und Spiro, I. Jahrg., S. 777.

††) Über die Verdaulichkeit des Leims. Pflügers Archiv 48, 100 (1891).

†††) Die primären Spaltungsprodukte, welche bei der Verdauung von Gelatine gebildet werden. Journ. of physiol. 12, 23 (1891).

*†) Über die Harnfarbstoffe aus der Indigogruppe und über die Pankreasverdauung. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. 7, 1593 (1874).

*††) Zur Kenntnis der Glutinverdauung. Centralbl. f. d. med. Wiss. Nr. 16 (1877).

*†††) Über die Einwirkung von Trypsin auf Leim. Zeitschr. f. physiol. Chem. 34, 119 (1901).

besitzen. Zur Verwendung kam das käufliche Caseinum puriss. Merck, das mehrere Male aus verdünnter Natriumkarbonatlösung mit Essigsäure ausgefällt wurde. Der frisch gefällte Niederschlag, der starke Millonsche Reaktion gab, wurde in der früher geschilderten Weise*) jodiert und nach beendeter Jodaufnahme durch Dialyse gegen anfangs fliefsendes, dann destilliertes Wasser vom überschüssigen Jod befreit. Aus der salzfreien Lösung wurde das Jodkasein mit Alkohol von 95 Proz. gefällt, auf einem Seidenfilter gesammelt und getrocknet.

Reines Glutin wurde nach dem von Faust**) angewendeten Verfahren dargestellt.

Reinste käufliche Gelatine wurde in destilliertem Wasser aufquellen gelassen, dann das Wasser nach 24 stündigem Stehen in der Kälte abgegossen und frisches Wasser und etwas Ammoniak zugesetzt. Nach abermaligem 24 stündigen Stehen wurde bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gewaschen. Hierauf erfolgte die gleiche Behandlung mit Wasser, das mit etwas Essigsäure angesäuert worden war. Sodann wurde erst mit reinem Wasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion gewaschen, hierauf mehrere Tage mit 10 proz. Chlornatriumlösung extrahiert und neuerdings mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaktion behandelt. Nun wurde die Gelatine durch Erwärmen auf etwa 50° in wenig Wasser gelöst, zu der Lösung Alkohol bis zur beginnenden Trübung hinzugefügt und die wässerig-alkoholische Lösung warm filtriert. Aus dem Filtrat schied sich auf weiteren Zusatz von Alkohol von 95 Proz. die Gelatine in Gestalt weifser, feiner Flocken aus. Dieselben wurden auf Seide gesammelt und die ganze Prozedur noch einmal wiederholt. Sodann wurde mit Wasser so lange gewaschen, bis der Alkohol vollständig entfernt war, endlich der Niederschlag in warmem Wasser gelöst. Die Lösung gab, mit Millons Reagens erhitzt, eine ganz schwache, kaum wahrnehmbare Rosafärbung, während die Flocken eine rötlich-braune Farbe annahmen.

Das gelöste Glutin wurde in der schon erwähnten Weise jodiert.

Nach vollendeter Jodierung wurde die überschüssiges Jod enthaltende Lösung im Pergamentschlauch gegen lauwarmes Wasser im Brutschrank dialysiert, unter so lange fortgesetzter Erneuerung des Wassers, bis dasselbe kein Jod bezw. Jodid mehr aufnahm. Dann wurde der Inhalt des Schlauches mit Alkohol versetzt und der in hellgelben Flocken sich ausscheidende Leim abfiltriert, getrocknet und zur Jodbestimmung verwendet.

Die Bestimmungen des Jodgehalts erfolgten in derselben Weise wie früher*).

Die Analyse ergab folgende Werte:

*) Über die jodhaltigen Spaltungsprodukte des Eiweifses. Diese Beiträge 3, 391 (1903).

**) Über das Glutolin, ein Albuminoid des Blutserums. Archiv f. experim. Path. u. Pharm. 41, 309 (1898).

Jodkasein.

Präparat		g gaben	g		=	Proz.	
Präparat	I	0,3574 g gaben	0,04717 g	J	=	13,19 Proz.	J
„	I	0,4654 „ „	0,0626 „	„	=	13,46 „	„
„	II	0,4581 „ „	0,0518 „	„	=	11,30 „	„ *)
„	I	0,3432 „ „	0,0035 „	Asche	=	1,01 „	Asche

Jodglutin.

Präparat		g gaben	g		=	Proz.	
Präparat	I	0,2801 g gaben	0,0040 g	J	=	1,43 Proz.	J
„	II	0,2826 „ „	0,0034 „	„	=	1,20 „	„
„	II	0,3727 „ „	0,0055 „	„	=	1,47 „	„
„	III	0,3882 „ „	0,0083 „	„	=	2,14 „	„
„	III	0,3502 „ „	0,00645 „	„	=	1,85 „	„
„	I	0,2183 „ „	0,0044 „	Asche	=	2,06 „	Asche
„	II	0,2604 „ „	0,0040 „	„	=	1,53 „	„
„	III	0,2939 „ „	0,0025 „	„	=	0,85 „	„

Auf aschefreie Substanz berechnete Mittelzahlen:

Jodkasein **)	Jodglutin
I 13,45 Proz. J	I 1,46 Proz. J
II 11,43 „ „	II 1,34 „ „
	III 2,00 „ „

Wie aus diesen Ziffern ersichtlich, enthält das Jodkasein 11,43 bis 13,45 Proz. Jod, das Jodglutin blofs 1,34 bis 2,0 Proz. Jod. Daraus ergiebt sich, dafs das Kasein auch in seinem Jodbindungsvermögen der Protalbumose gleicht, welche ebenfalls 11 bis 13 Proz. Jod bindet, das Glutin dagegen sich völlig verschieden von der Heteroalbumose verhält, welche ja 10,2 Proz. Jod zu binden vermag.

Aus diesem Verhalten dem Jod gegenüber lassen sich einige Schlüsse ziehen auf die Natur der jodbindenden Gruppe des Eiweifsmoleküls.

Da das Glutin keine oder doch nur eine minimale Millonsche Reaktion gab, so konnte es nicht wohl Tyrosin sein, welches das Jod gebunden hatte. Daraus ergiebt sich in Übereinstimmung mit meinen Befunden an den Jodalbumosen ***), dafs das Tyrosin nicht die einzige jodbindende Gruppe des Eiweifses darstellt.

---

*) Wie aus diesen Zahlen ersichtlich, zeigt das Jodkasein ähnlich den übrigen Eiweifskörpern [vgl. diese Beiträge 3, 391 (1903)] einen etwas schwankenden Jodgehalt.

**) Liebrecht [Ber. d. Deutsch. chem. Gesellsch. 30, 1824 (1898)] und Blum und Vaubel [Journ. für prakt. Chem., N. F. 57, 365 (1898)] fanden im Jodkasein nur 5,7 bezw. 6 bis 7 Proz. Jod.

***) Diese Beiträge 3, 413 (1903).

Bei Gelegenheit meiner Untersuchungen über Jodheteroalbumose habe ich darauf hingewiesen, dafs diese Albumose, trotzdem sie kein oder nur wenig Tyrosin enthält, ein sehr grofses Jodbindungsvermögen besitzt. Es ist weiterhin wahrscheinlich gemacht worden, dafs es der darin vorkommende, nicht hydroxylierte Benzolkern, das Phenylalanin, ist, welcher das Jod aufnimmt. Um ähnliche Verhältnisse dürfte es sich nun auch beim Leim handeln. Denn dafs im Leim der aromatische Komplex nicht fehlt, ist schon von verschiedenen Autoren hervorgehoben worden, so von A. Schlieper*), G. Guckelberger**), E. Schulze***), welche bei der Oxydation von Leim mit Chromsäure, mit Braunstein und Schwefelsäure und mit Kaliumbichromat und Schwefelsäure Benzoesäure erhielten, ferner von R. Maly †), welcher diese Befunde bestätigte, dann von Nencki ††), Selitrenny †††), die auf verschiedenem Wege das Vorkommen von Phenylalanin im Leim wahrscheinlich machten. Endlich ist es K. Spiro *†) und E. Fischer, Levene und Aders *††) gelungen, das Phenylalanin unter den Spaltungsprodukten des Leims direkt nachzuweisen bezw. durch Überführung in Zimtsäure als solches zu identifizieren.

Allein aus allen diesen Untersuchungen scheint hervorzugehen, dafs die aromatische Gruppe im Leim jedenfalls nicht reichlich vertreten ist. Den höchsten Gehalt an Phenylalanin giebt Selitrenny *†††) an und zwar zu 2 bis 3 Proz. Damit stimmt die Thatsache überein, dafs nur wenig Jod in das Molekül des Leims eintritt. Es darf daher als sehr wahrscheinlich bezeichnet werden, dafs das Phenylalanin der jodbindende Bestandteil des Leims ist.

---

*) Ann. d. Chem. u. Pharm. 59, 1.

**) Ebenda 64, 39.

***) Untersuchungen über die Amidosäuren, welche bei der Zersetzung der Eiweifsstoffe durch Salzsäure und durch Barytwasser entstehen. Zeitschr. f. physiol. Chem. 9, 120, Anhang (1885).

†) Über die bei der Oxydation von Leim mit Kaliumpermanganat entstehenden Körper u. s. w. Monatsh. f. Chem. 10, 26 (1889).

††) Über die Zersetzung der Gelatine und des Eiweifses bei der Fäulnis. Festschr. f. G. Valentin. Bern 1876.

†††) Wiener Monatshefte 10, 908 (cit. nach Spiro).

*†) Die aromatische Gruppe des Leims. Diese Beiträge 1, 347 (1901).

*††) Über die Hydrolyse des Leims. Zeitschr. f. physiol. Chem. 35, 70 (1902).

*†††) loc. cit.

2. Einführung von Jod in die tryptischen Spaltungsprodukte des Eiweifses.

In einer vorhergehenden Abhandlung ist auseinandergesetzt worden, dafs ich über die Natur der jodbindenden Gruppe des Eiweifses dadurch Aufschlufs zu erhalten hoffte, dafs ich das Eiweifs zuerst spaltete und in die Spaltungsprodukte mit Hülfe der gleichen Methode, welche zur Jodierung des intakten Eiweifsmoleküls gedient hatte, Jod einzuführen suchte. In dieser Absicht hatte ich die peptischen Spaltungsprodukte des Fibrins jodiert und war dabei, unter Zuziehung unserer sonstigen Kenntnisse von dem Bau dieser Körper, zu dem Schlusse gekommen, dafs neben Tyrosin ein anderer nicht hydroxylierter, aromatischer Kern, vermutlich Phenylalanin, an der Jodbindung beteiligt ist.

Es ist nicht zu leugnen, dafs durch die Zerlegung des Eiweifses in seine Bestandteile andere Verhältnisse für die Jodaufnahme geschaffen werden, indem z. B. aus Kernen, welche im intakten Eiweifsmolekül kein Jod aufnehmen, bei der Hydrolyse Körper entstehen können, welche alsdann Halogen zu binden vermögen.

Wenn dies bei höheren Spaltungsprodukten, wie sie die Pepsinverdauung liefert, nicht zu befürchten stand, so liegen die Dinge wesentlich anders bei der tieferen Zerlegung mittels Trypsins.

Wie wir sehen werden, haben jedoch die Versuche sowohl mit den tryptischen wie mit den peptischen Spaltungsprodukten das gleiche Resultat ergeben wie jene mit den beiden ungespaltenen Eiweifskörpern, dem Kasein und dem Leim.

Zur Jodierung gelangte zuerst selbstverdautes Pankreas, welches in schwach alkalischem Wasser und unter Zusatz von Toluol mehrere Monate im Brutschrank gestanden hatte und die Biuretreaktion nicht mehr gab. Nachdem die Lösung vom Ungelösten abfiltriert, das Toluol durch längeres Kochen vertrieben und ein auf Essigsäurezusatz entstandener brauner (die Biuretreaktion nicht gebender) Niederschlag entfernt worden war, wurde das mit Natriumbikarbonat schwach alkalisch gemachte Filtrat in der üblichen Weise jodiert. Mit Silbernitrat wurde ein in verdünnter Salpetersäure löslicher Körper isoliert, der sich nach Entfernung des Silbers als jodhaltig erwies, der sich aber bei gleicher Behandlungsweise der Krystallisation ebenso unzugänglich erwies wie die früher geschilderten jodhaltigen Spaltungsprodukte des Eiweifses *).

Um mich über das Verhalten und die Zusammensetzung event. gebildeten Jodtyrosins zu orientieren, habe ich, da Angaben über

*) Vgl. diese Beiträge 3, 391 (1903).

diesen Körper in der Litteratur nicht vorliegen *), reines Tyrosin der Jodierung unterworfen.

Chemisch reines Tyrosin wurde in heifsem Wasser gelöst, die Lösung auf 50⁰ abkühlen gelassen, mit etwas Natriumbikarbonat versetzt, eine gesättigte Auflösung von Jod in Jodkalium zugefügt und die Mischung eine halbe Stunde unter zeitweiligem Umschütteln im Wasserbade bei 45⁰ gehalten. Nach dieser Zeit gab die Lösung die Millonsche Reaktion nicht mehr. Durch Zusatz von Essigsäure wurde versucht, das Jodtyrosin in der gleichen Weise wie die Jodeiweifskörper niederzuschlagen, was jedoch nicht gelang.

Zur Gewinnung der Jodverbindung wurde daher die noch viel überschüssiges Jod enthaltende Lösung mit Silbernitrat versetzt, der reichliche Niederschlag mit verdünnter, vorher gekochter Salpetersäure ausgezogen und dann abfiltriert. Das weingelbe klare Filtrat liefs auf Zusatz von verdünntem Ammoniak einen weifsen flockigen Niederschlag ausfallen. Derselbe wurde mehrere Male umgefällt, mit Wasser gewaschen, entsilbert und das klare Filtrat auf dem Wasserbade eingeengt. Allein selbst nach mehrwöchentlichem Stehen schieden sich keine Krystalle aus. Im Exsikkator über Schwefelsäure trocknete der Sirup zu dünnen, durchsichtigen, hellbraunen, amorphen Lamellen ein, die leicht vom Glase entfernt werden konnten.

Das Präparat ergab 63,18 Proz. Jod **).

0,0685 g gaben 0,04327 g J = 63,18 Proz. J.

Berechnet für	$C_9H_9NO_3J_2$	58,64 Proz. J
„ „	$C_9H_8NO_3J_3$	64,97 „ „

Aus diesen Zahlen scheint hervorzugehen, dafs in das Tyrosin drei Atome Jod eingetreten sind.

Hiermit erscheint der Beweis geliefert, dafs unter den gewählten Versuchsbedingungen das Tyrosin Jod zu binden vermag.

Es wurde vorhin erwähnt, dafs die Befunde am Leim und an der Heteroalbumose ergeben haben, dafs das Tyrosin jedenfalls nicht der einzige jodbindende Komplex des Eiweifses sei.

Um die Produkte der tryptischen Spaltung nach dieser Richtung hin zu prüfen, wurde folgender Versuch angestellt.

Eine Lösung von (jodfreiem) Thyreoglobulin***) wurde mit frischem, zerkleinertem Pankreas versetzt und unter Zusatz von etwas Soda bis zur schwach alkalischen Reaktion und Toluol mehrere Monate im Brutschrank verdauen gelassen. Aus der filtrierten Verdauungslösung, welche keine Spur von Biuretreaktion mehr gab, wurden die basischen Bestandteile mit Phosphorwolframsäure entfernt und das Filtrat von der überschüssigen Phosphorwolframsäure in der üblichen Weise mit Baryt

*) Vaubel (Chem.-Zeitg. 23, Nr. 98, 1078 [1900]) giebt an, Tyrosin jodiert zu haben. Die Beschreibung seines Produktes fehlt.

**) Vaubel fand in seinem Jodtyrosin 26,0 Proz. Jod = $^1/_2$ J im Molekül.

***) Der Verdauungsversuch war zuerst für andere Zwecke bestimmt.

befreit und der überschüssige Baryt in der Wärme mit Schwefelsäure entfernt. Aus dem eingeengten Filtrat krystallisierten nach längerem Stehen Leucin und Tyrosin aus. Dieselben wurden abfiltriert und das sirupöse Filtrat mit Alkohol von 95 Proz. ausgezogen. Der alkoholische Auszug gab starke Millonsche Reaktion, der Rückstand dagegen schwache. Dieser wurde alsdann so lange mit Alkohol ausgekocht, bis er schliefslich keine Spur von Millonscher Reaktion mehr gab, also völlig tyrosinfrei war. Die Xanthoproteinreaktion fiel dann noch positiv aus.

Dieser Rückstand wurde in Wasser gelöst und der Jodierung unterworfen. Beim Ansäuern der Lösung mit Essigsäure bildete sich ein geringer ockerfarbener Niederschlag, welcher abfiltriert wurde. Das Filtrat wurde hierauf mit Silbernitrat im Überschufs versetzt, der Niederschlag abfiltriert, mit verdünnter, ausgekochter Salpetersäure ausgezogen und filtriert. Das Filtrat gab bei der Neutralisation mit verdünntem Ammoniak einen weifsen Niederschlag, welcher mit Wasser gewaschen und entsilbert sich als jodhaltig erwies.

Damit war gezeigt, dafs unter den Spaltungsprodukten des Eiweifses aufser dem Tyrosin noch ein anderer Körper vorhanden war, welcher Jod zu binden vermag.

Welcher Natur dieser Körper ist, bleibt noch unentschieden. Dafs er das von Emerson*) aus dem Pankreasverdauungsgemisch isolierte p-Oxyphenyläthylamin nicht ist, liegt auf der Hand, denn die Lösung gab keine Millonsche Reaktion. Nur so viel vermag ich zu sagen, dafs das Jodprodukt beim Schmelzen mit Ätznatron keinen Geruch nach Skatol bezw. Indol lieferte, dagegen, wie schon hervorgehoben, die Xanthoproteinreaktion gab. Erwähnt sei auch, dafs der Jodkörper nur in geringer Menge vorhanden war. Vielleicht handelte es sich um Phenylalanin.

Zum Schlufs sei auf einen Punkt von allgemeiner Bedeutung für die Chemie der Eiweifskörper hingewiesen. Aus den vorliegenden und meinen früheren Untersuchungen scheint hervorzugehen, dafs das Jod ausschliefslich oder vorwiegend in den aromatischen Kern eintritt. Wenn sich dieser Befund allgemein bestätigen sollte, so wäre uns in der Jodierung ein einfaches und bequemes Mittel gegeben, bei den verschiedenen Eiweifsarten über die quantitativen Verhältnisse des aromatischen Komplexes (Phenyl- und Phenolgruppen) Aufschlufs zu gewinnen.

Aber auch für den Fall, dafs sich nachträglich herausstellen sollte, dafs neben den aromatischen noch andere ungesättigte Gruppen des Eiweifses an der Jodaufnahme beteiligt sind, dürfte die Halogeneinführung in die Proteinstoffe gelegentlich wichtige Aufschlüsse über Natur und Zahl der beteiligten Gruppen gewähren.

*) Über das Auftreten von Oxyphenyläthylamin bei Pankreasverdauung und über fermentative CO_2-Abspaltung. Diese Beiträge 1, 501 (1902).

Kürzere Mitteilungen.

5. Gepaarte Glykuronsäuren als Bestandteile der Galle.

Von Dr. E. C. van Leersum.

(Aus dem Laboratorium pathologicum der Universität in Amsterdam.)

In einem Aufsatze: Über die Ausscheidung der Glykuronsäure*) sagt M. Bial in Anbetracht der Herkunft der Glykuronsäure: „Zwei Fälle waren denkbar: 1. dafs die Glykuronsäure als ein Produkt der Darmverdauung im Darm auch entstände; 2. dafs sie in den Darm erst importiert würde." Und einige Zeilen weiter unten läfst er folgen: „Ich verkenne nun gar nicht, dafs diese Beobachtung (d. h. positiver Ausfall der Orcinreaktion in Kaninchengalle) keinen vollgültigen Beweis für die Anwesenheit der Glykuronsäure abgiebt, aber es besteht danach doch eine nicht geringe Wahrscheinlichkeit dafür." Dafs gepaarte Glykuronsäuren zu den Bestandteilen des normalen Darminhaltes gehören, hat er schon früher**) gezeigt. Gerade diese Publikation hat mich zur Untersuchung normaler Galle vom Rind angeregt, da ich der Meinung war, dafs gepaarte Glykuronsäuren aus der Leber stammen, eine Ansicht, welche inzwischen ihre Begründung in den Untersuchungen Embdens***) gefunden hat.

Die Galle aus 5 Gallenblasen vom Rind wurde von mir bis auf 300 ccm auf dem Wasserbade eingeengt, die zähflüssige Masse mit 50 ccm verdünnter Schwefelsäure (20 ccm H_2SO_4, 30 ccm H_2O) angesäuert und danach mit 300 ccm Alkohol von 95 Proz. und 1 Liter Äther gemischt und das Gemenge 8 Tage unter häufigem Schütteln stehen gelassen. Der Ätherauszug wurde nun abgegossen, der Äther abdestilliert und der Rückstand auf dem Wasserbade so lange erwärmt, bis aller Äther- und Alkoholgeruch verschwunden war. Nun wurde der Rückstand mit Tierkohle gemischt, kurze Zeit erhitzt und darauf abfiltriert.

Eine Probe des schwach gelblich gefärbten Filtrats gab keine positive Orcinreaktion. Nachdem ich eine zweite Probe mit verdünnter Schwefelsäure einige Minuten gekocht hatte, bekam ich nach

*) Zeitschr. f. klin. Med. 47, 5. u. 6. Heft, 489.

**) Diese Beitr. 2, 528.

***) Daselbst 2, 591.

weiterem Erhitzen mit Salzsäure und Orcin eine schmutzig braungrün gefärbte Flüssigkeit, welche ihre Farbe an Amylalkohol abgab, worin sodann der charakteristische Streifen zwischen Rot und Grün deutlich wahrzunehmen war.

Die gelblich gefärbte Flüssigkeit zeigte keine Linksdrehung. Nachdem ich sie aber eine Stunde lang in einer gut verschlossenen Flasche mit Schwefelsäure (Gehalt 2 Proz.) im Wasserbade erhitzt hatte, zeigte sie eine äufserst geringe Rechtsdrehung.

Die Flüssigkeit zeigte nun folgende Eigenschaften: Durch Kochen mit Phloroglucin und Salzsäure färbte sie sich schwach rot; die Farbe verschwand aber bald. Kochen mit Orcin und Salzsäure ergab eine schön grüne Farbe, welche mit Leichtigkeit in Amylalkohol übergeführt werden konnte. Der Amylalkohol zeigte besonders schön den Absorptionsstreifen zwischen Rot und Grün. Fehlingsche Flüssigkeit wurde in der Hitze reduziert; nach längerem Stehen setzte sich ein roter Niederschlag im Reagenzrohr ab.

Leider konnte ich aus der Flüssigkeit keine p-Bromphenylhydrazinverbindung darstellen. Möglicherweise war der Gehalt an Glykuronsäure zu diesem Zwecke zu gering. Indessen wird dies bei Verwendung gröfserer Mengen Galle (bezw. Fel taur. insp.) wahrscheinlich gelingen.

Den Befund Bials, namentlich die Anwesenheit von Glykuronsäure in normalen Fäces, kann ich ebenfalls bestätigen. Es gelang mir mittels des von Bial eingeschlagenen Verfahrens, die genannte Säure in einer Portion normaler Fäces (etwa 300 g) nachzuweisen. Diesem Befunde zufolge glaube ich zu der Annahme berechtigt zu sein, dafs gepaarte Glykuronsäuren zu den normalen Bestandteilen der (Ochsen-) Galle gerechnet werden können, und dafs sie mit dieser in den Darm gelangen.

Amsterdam, 16. Dezember 1902.

6. Bemerkung zu dem Aufsatz: Über das Bordetsche Laktoserum.

Von Dr. **Ernst Fuld**, Assist. am pharmakol. Institut zu Halle a. S.

In Bd. II, Heft 7 bis 9 dieser Zeitschrift hatte ich über die Reaktion von Kaninchen gegen Injektion von Kuhmilch berichtet und dabei erwähnt, dafs diese ausblieb, als ich zur Injektion Nutroselösung oder gekochte Milch anwandte. Da die verwendeten Tiere aus derselben Quelle und zur gleichen Zeit bezogen waren, in derselben Weise gefüttert und behandelt wurden, wie die erfolgreich injizierten, denen sie vollkommen ähnlich waren, so glaubte ich, dafs aus dem Ausbleiben der Reaktion in diesen, ihrem Auftreten in jenen Fällen weitere Schlüsse gezogen werden dürften. Da nun Tiere, denen mäfsig erwärmte Milch eingespritzt worden war, ein Serum lieferten, das auch gegen gekochte



(oder sterilisierte) Milch und Nutrose wirksam war, so nahm ich an, „dafs die Fähigkeit, mit einem Antikörper zu reagieren, und die Fähigkeit, seine Bildung im Tierkörper zu veranlassen, durchaus zu trennen sind“.

In überaus dankenswerter und liebenswürdiger Weise macht mich nun Herr Dr. Morgenroth, Mitglied des Instituts für experimentelle Therapie in Frankfurt a. M., darauf aufmerksam, dafs zahlreiche entgegenstehende Resultate in der neueren Litteratur*) ihn veranlafsten, meine Versuche mit den ungleich gröfseren Mitteln des Instituts für experimentelle Therapie zu wiederholen, und dafs seine Wiederholung zu dem Resultat führte, dafs in verschiedenen Versuchsreihen mit roher und gekochter Milch die Relation in der Stärke der Sera unregelmäfsig wechselte.

Diese Mitteilung veranlafste mich, den Versuch auch meinerseits wieder aufzunehmen, eine Reaktion des Kaninchens gegen Injektion von gekochter Milch zu erzielen.

Zwei Kaninchen (allerdings aus anderer Quelle bezogen) erhielten, wie früher beschrieben, Injektionen gekochter Magermilch in steigender Quantität, zuletzt 60 bezw. 80 ccm. Die Injektionen wurden mit starker Gewichtsabnahme beantwortet. Die Menge der abgeprefsten Sera war bei gleichem Körpergewicht und gleicher Blutmenge auffällig verschieden, übereinstimmend aber ihre Fähigkeit, mit dem Zehntel Volum Kuhmilch sofort energisch zu reagieren**).

Ich kann also auf meine früheren negativ ausgefallenen Versuche kein Gewicht mehr legen.

Da es mir aus äufseren Gründen nicht möglich sein wird, in nächster Zeit auf diesen Gegenstand zurückzukommen, so sei es gestattet, noch einiges über das Verhalten des erhaltenen Laktoserums zu sagen.

Eine Wägung des Niederschlages liefs kaum mehr Zweifel, dafs er das gesamte Kasein enthält.

Mit der berechneten Menge Oxalat gekocht und filtriert, ergiebt die Milch einen viel unbedeutenderen Niederschlag (offenbar auch diesen nur vermöge des Kalkgehalts im Serum).

Der mit dem zehnfachen Volum Alkohol erhaltene und unter Alkohol aufbewahrte Niederschlag aus dem Serum, in schwach salzhaltigem Wasser gelöst, war unwirksam.

Nach der Injektion von zuletzt 80 (im ganzen 150) ccm Milch resultierte ein Serum, das ein Fünftel Volum Magermilch noch klärt, durch weiteren Zusatz aber getrübt wurde.

Jedenfalls also läfst sich mit gekochter Milch ein Laktoserum von ganz beträchtlicher Stärke gewinnen.

---

*) Moro, Wiener klin. Wochenschr. 1901, Nr. 44. — Aschoff u. Meyer, Berliner klin. Wochenschr. 1902, Nr. 7. — P. Müller, Zentralbl. f. Bakt. 32, Nr. 7.

**) Auch ein (wenig Fibrin lieferndes) pleuritisches Exsudat des einen Versuchstieres zeigte sich wirksam, wiewohl in geringerem Grade.

XXX.

Die Acidität des Harns vom Standpunkt der Ionenlehre.

Von **Rudolf Höber.**

Mit Versuchen von **P. Jankowsky.**

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Zürich.)

Es sind noch bis in die letzte Zeit hinein immer wieder neue Vorschläge zur Bestimmung der Harnacidität gemacht worden, deren Willkürlichkeit nicht erst durch viele mühselige Versuche nachzuweisen nötig gewesen wäre, wenn das Massenwirkungsgesetz, besonders in seiner Anwendung auf die Gleichgewichte zwischen Ionen, schon Allgemeingut geworden wäre; es würden Methoden wie die von Freund*), Lieblein**), de Jager***) vom Physikochemiker ohne weiteres beiseite gelegt worden sein ohne langes Nachprüfen †). Überflüssige Arbeit ist auch vielfach verwendet worden auf das Durchprobieren von allerhand Indikatoren bezüglich ihrer Brauchbarkeit bei der Titration des Harns; hier hätte die Kenntnis der physikochemischen Theorie der Indikatoren die Mühe leicht sparen und einen bestimmten Indikator als am besten brauchbar angeben können. Und trotz der vielfältigen Vorschläge und Verbesserungen existiert doch bis heute kein anerkanntes Verfahren für die Aciditätsmessung des Harnes. Es werden also neue Wege aufgesucht und anempfohlen werden. Vielleicht dafs aus diesen Gründen eine kurze Diskussion der bisherigen Erfahrungen

---

*) Centralbl. f. d. medizin. Wissensch. 1892, S. 689.

**) Zeitschr. f. physiol. Chem. 20, 73 (1894).

***) Ebenda 24, 308 (1896).

†) Nägeli, ebenda 30, 313 (1900) und Arnstein, ebenda 34, 1 (1901).

vom Standpunkt der physikalischen Chemie aus zusammen mit einer Erörterung über die Möglichkeiten der Aciditätsbestimmung im allgemeinen vor manchen Irrtümern schützen, den Wert des Vorhandenen herausheben und auch zur Lösung der zweifellos schwierigen Frage einiges beitragen kann.

Der Begriff der Acidität.

Wenn die Aufgabe gestellt wird, die Acidität einer Säure zu bestimmen, so giebt es zwei Möglichkeiten für ihre Lösung je nach der Definition der Acidität. Der Physikochemiker definiert eine Säure als eine chemische Verbindung, die, in Wasser gelöst, Wasserstoffionen H^+ abdissoziiert, also dem Wasser, welches selbst in reinstem Zustande bei Zimmertemperatur im Liter ungefähr $0{,}8 . 10^{-7}$ g H^+ enthält, einen höheren H^+-Gehalt erteilt; er bezeichnet als eine starke Säure, als einen Stoff von hoher Acidität eine chemische Verbindung, von der ein Mol in einer begrenzten Zahl von Litern, etwa in 32 Litern, gröfstenteils dissoziiert, als eine schwache Säure dagegen, als einen Stoff von niedriger Acidität eine Verbindung, die relativ schwach dissoziiert; für ihn ist die Acidität einer $^1/_{32}$ n-Salzsäure etwa 40 mal so grofs als die einer $^1/_{32}$ n-Essigsäure, weil in dieser Verdünnung der Dissoziationsgrad der Salzsäure 0,97, der der Essigsäure nur 0,024 beträgt. Der Chemiker definiert dagegen eine Säure als eine chemische Verbindung, in der an Stelle von Wasserstoffatomen Metallatome treten können, die den Säurecharakter neutralisieren, und er mifst die Acidität einer Säure an der Menge Lauge, die zugesetzt werden mufs, damit das Metall den Säurewasserstoff vollständig verdrängt, welcher sich mit dem Hydroxyl der Lauge zu Wasser verbindet; für ihn hat ein Liter $^1/_{32}$ n-Salzsäure und ein Liter $^1/_{32}$ n-Essigsäure dieselbe Acidität, weil beide zur Neutralisation gleich viel Lauge verbrauchen.

Betrachten wir diesen Neutralisationsprozefs ganz kurz vom physikochemischen Standpunkt aus! In einer reinen Säurelösung befinden sich nebeneinander die Säuremoleküle HR und ihre Ionen H^+ und R^-. Bezeichnen wir die Konzentrationen dieser drei Bestandteile mit c_{HR}, c_H und c_R, so ergiebt das Massenwirkungsgesetz, dafs $\frac{c_H \cdot c_R}{c_{HR}} = k$ ist. Bezeichnen wir ferner die Konzentrationen der Ionen des Wassers mit c_H und c_{OH}, so folgt aus einer ganzen Anzahl sehr verschiedenartiger Messungen, dafs bei

Zimmertemperatur stets $c_H \cdot c_{OH} = 0{,}64 \cdot 10^{-14} = k_1$ ist. In der wässerigen Lösung einer Säure überwiegt demnach c_H über c_{OH}, in der Lauge überwiegt umgekehrt c_{OH} über c_H, in reinem Wasser oder in der Lösung eines echten Salzes sind c_H und c_{OH} gleich grofs.

Fügt man nun zum Zweck der Neutralisation zu einem Quantum Säurelösung einen Tropfen NaOH, so dissoziiert die Lauge vollständig in Na^+ und OH^-; das OH^- mufs sich dann mit H^+ zu HOH verbinden, weil das Produkt $c_H \cdot c_{OH}$ gröfser als k_1 geworden ist. Es verschwindet also H^+; dadurch ist das Gleichgewicht $\frac{c_H \cdot c_R}{c_{HR}} = k$ gestört, es mufs HR weiter dissoziieren in $H^+ + R^-$, bis das Gleichgewicht wiederhergestellt ist. Der Endeffekt ist also Zunahme an c_R und entsprechende Abnahme an c_H, also Zunahme an c_{OH}. Ein zweiter, dritter und weitere Tropfen NaOH wirken genau so; mehr und mehr Wasserstoff der Säuremoleküle wird Ionenwasserstoff, und schliefslich, wenn alle Säuremoleküle aufgespalten sind und ihr H^+ sich mit OH^-, mit der äquivalenten Menge OH^-, verbunden hat, sind in der Lösung ebenso wie sonst in reinem Wasser c_H und c_{OH} gleich geworden, $c_H \cdot c_{OH}$ ist gleich $0{,}8 \cdot 10^{-7} \cdot 0{,}8 \cdot 10^{-7} = 0{,}64 \cdot 10^{-14}$, die Lösung ist neutral. Wie man den Moment erkennt, in dem $c_H = c_{OH}$ wird, davon später.

Nach diesen Erörterungen kann man nun den Inhalt der beiden genannten Aciditätsmethoden, der physikochemischen und der titrimetrischen, kurz so zusammenfassen: die erste Methode mifst die Konzentration der aus den Säuremolekülen abgespaltenen, effektiv vorhandenen „aktuellen“ Wasserstoffionen, die zweite mifst sowohl diese als auch den Wasserstoff, der zu Beginn der Bestimmung noch im Säuremolekül fest gebunden ist, aber in ihrem Verlauf ionisiert wird, also die „aktuellen“ und die „potentiellen“ Wasserstoffionen (Ostwald). (Die Auseinandersetzung über die zweite Methode ist nur bedingt richtig; die nötigen Ergänzungen werden sich aus dem Folgenden von selbst ergeben.)

Die Methoden sind nun, scheint mir, beide für die Untersuchung der Harnacidität von Interesse. Um das zu zeigen, mufs ich etwas weiter ausgreifen.

Das Zustandekommen der Harnacidität.

Der Harn ist ein Sekret, das aus Blutbestandteilen gebildet wird. Er ist von wechselnder Zusammensetzung, weil das Blut, das in unregelmäfsiger Weise von verschiedenen Quellen aus mit

chemischen Verbindungen gespeist wird, von den Nieren auf einer einigermafsen konstanten Zusammensetzung erhalten werden mufs. Konstant ist unter anderen bis zu einem gewissen Grade der Gehalt des Blutes an OH^-, der seine Alkaleszenz bedingt; er schwankt nach meinen Untersuchungen*) zwischen $0{,}22 . 10^{-5}$ und $0{,}9 . 10^{-5}$ Gramm -OH^- pro Liter. Nun entstehen im Körper durch die Oxydation von Schwefel und durch die Hydrolyse der phosphorsäurehaltigen Nukleine freie starke Säuren, also Verbindungen, die reichlich H^+-Ionen bilden, und wenn diese Ionen ins Blut gelangen, so müssen sie, entsprechend der Überschreitung des Produktes $c_H . c_{OH} = 0{,}64 . 10^{-14}$ [bei Bluttemperatur ungefähr $2.2 . 10^{-14}$ **)], OH^- wegfangen. Die Gegenwart der OH-Ionen in den Säften des Körpers ist aber sehr nötig, die Oxydationsprozesse, die Arbeitsfähigkeit der Muskulatur, die Vorgänge beim Wachstum sind an ihre Gegenwart gebunden; der Körper kann eine starke Verminderung des OH^--Gehalts vom Blute nicht ertragen. Wäre nun im Blut das Hydroxyl nur in Form der aktuellen Ionen einer enorm verdünnten, nämlich nur etwa $0{,}5 . 10^{-5}$-normalen, vollständig dissoziierten Lauge vorhanden, so brauchten nur etwa 0,4 mg Schwefel zu Schwefelsäure verbrannt zu werden und ins Blut zu gelangen, um schon sämtliche Lauge in den 5 Litern Blut des Erwachsenen zu neutralisieren. Zum Glück sind aber neben den aktuellen reichlich potentielle OH-Ionen vorhanden, welche Verluste an aktuellen in weitgehendem Mafse zu decken vermögen. Wo findet sich dieses potentielle OH^-?

Es besteht neben manchen anderen Gleichgewichten im Blut eins zwischen den Ionen H^+, $HPO_4^=$ und $H_2PO_4^-$, derart dafs $\frac{c_H . c_{HPO_4}}{c_{H_2PO_4}} = k_2$ ist, entsprechend einer reversiblen Reaktion $H_2PO_4^- \rightleftarrows H^+ + HPO_4^=$. Das Anion eines primären Phosphates $H_2PO_4^-$ verhält sich also wie eine Säure, die zum Teil dissoziiert. Da $c_H . c_{OH} = k_1$ ist, so läfst sich auch das Gleichgewicht durch die Beziehung ausdrücken:

$$\frac{k_2}{k_1} = K = \frac{c_{HPO_4}}{c_{OH} . c_{H_2PO_4}}$$

Das heifst: wenn c_{OH} verkleinert wird, mufs sich das Gleichgewicht in dem Sinne verschieben, dafs $H_2PO_4^-$ sich bildet, $HPO_4^=$

*) Pflügers Archiv 81, 522 (1900) und Höber, Physik. Chem. d. Zelle u. d. Gewebe 1902, S. 241.

**) Siehe Ley, Zeitschr. f. physik. Chem. 30, 193 (1899).

verschwindet; beides geschieht durch die hydrolytische Reaktion:

$$HPO_4^{=} + HOH \longrightarrow H_2PO_4^{-} + OH^{-}$$

Potentielle OH-Ionen des Wassers werden also aktuell, und der OH^{-}-Verlust des Blutes wird gedeckt oder wenigstens zum Teil gedeckt.

Ein ähnlich wirksames System von Bestandteilen beruht auf der Anwesenheit der Karbonate im Blut. Wird das Gleichgewicht

$$\frac{k_3}{k_1} = K_1 = \frac{c_{HCO_3}}{c_{OH} \cdot c_{H_2CO_3}}$$

durch Fortnahme von c_{OH} gestört, so erfolgt Kompensation durch die Hydrolyse: $HCO_3^{-} + HOH = H_2CO_3 + OH^{-}$.

In einem dritten Gleichgewicht spielen die Anionen der Harnsäure die Rolle der Phosphat- und Karbonatanionen.

Es steckt also der Blutvorrat an OH^{-}, aus dem sich schöpfen läfst, im Wasser, und verwertbar wird er durch den Gehalt des Blutes an „sauren“ Salzen von mehrbasischen Säuren, welche stufenweise dissoziieren.

Durch die geschilderten kompensatorischen Verschiebungen, die durch die Bildung von Säure oder richtiger von H^{+} im Körper eingeleitet werden — die ebenfalls vorkommende Bildung von OH^{-} wollen wir in dieser rein schematischen Darstellung aufser acht lassen —, steigt nun der Gehalt des Blutes an $H_2PO_4^{-}$, an H_2CO_3 u. a. über die Norm, die Nieren treten deshalb in Funktion und entfernen den Überschufs, welcher Harnbestandteil wird.

Aufser den genannten durch Oxydation und Hydrolyse im Organismus entstehenden starken Säuren können aber auch noch manche schwache Säuren sich bilden. Ihr Einflufs aufs Blut ist ein etwas anderer als der der starken Säuren, wie ich mit wenigen Worten auseinandersetzen will:

Es ist vielleicht nicht nötig, im einzelnen genau zu begründen, dafs sich die Blutflüssigkeit mit der Lösung einer schwachen Base vergleichen läfst; sie mag z. B. einer Lösung von Ammoniak an die Seite gestellt werden. Löst man nun äquivalente Mengen von Ammoniak und einer schwachen Säure, etwa Schwefelwasserstoff $H^{+}H^{+}S^{=}$ miteinander auf, so sind die Mengen H^{+} und OH^{-}, die die beiden bilden, wegen der Geringfügigkeit ihrer Dissoziationen nur klein; entsprechend der Überschreitung des Produktes $c_H \cdot c_{OH} = k_1$ vereinen sie sich aber zu Wasser, während die Ionen NH_4^{+} und $S^{=}$ unverbunden bleiben. Wenn dann weitere Mengen dissoziieren, so müssen eben wegen des Übrigbleibens des Basen-

kations und des Säureanions die Dissoziationsgleichgewichte der Base bezw. Säure $k_b = \frac{c_{NH_4} \cdot c_{OH}}{c_{NH_4OH}}$ und $k_S = \frac{c_{2H} \cdot c_S}{c_{H_2S}}$ bald erreicht sein, lange ehe alle Säure- und Basenmoleküle in die Ionen aufgespalten sind; es bleiben also gröfsere Mengen Base und Säure unverbunden nebeneinander in der Lösung. Daher riecht eine Lösung von $(NH_4)_2S$ sowohl nach Ammoniak wie nach Schwefelwasserstoff.

Ziemlich genau so ist es, wenn irgendwo im Körper gebildete schwache Säuren in den Kreislauf gelangen; so wenig ionisierte Säuren, wie Kohlensäure, Harnsäure oder auch wie die in pathologischen Fällen auftretenden, wie Leucin, Cystin, β-Oxybuttersäure und viele andere, können nur unvollkommen von den basischen Bestandteilen des Blutes neutralisiert werden, bleiben also frei und werden als störende Stoffe von den Nieren aus dem Kreislauf eliminiert.

In den Harn gelangt also, wenn wir uns, wie gesagt, mit der bisherigen absichtlich schematisch gehaltenen Auffassung der exkretorischen Funktion der Niere begnügen wollen, eine Reihe von Säuren; teils sind es neutrale Moleküle, teils Anionen ($H_2PO_4^-$, Harnsäureanion). Letztere können natürlich nur gleichzeitig mit entsprechenden Mengen Kation, z. B. Na^+, das Blut verlassen.

Im Harn gelöst dissoziieren nun die Säuren entsprechend ihrer Stärke, $H_2PO_4^-$ in H^+ und $HPO_4^{=}$, H_2CO_3 in H^+ und HCO_3^- u. s. w. Der Überschufs an H^+ über OH^- bedingt die Acidität des Harns im physikochemischen Sinne, der Gehalt an Wasserstoff, der vom Basenhydroxyd bis zum Auftreten der Neutralität $c_H = c_{OH}$ verbraucht wird, bedingt die Acidität im gewöhnlichen Sinne. Aus dem Gesagten ergiebt sich, dafs zwischen beiden Gröfsen keine einfachen Beziehungen zu existieren brauchen; denn je nach der Relation zwischen leichter und schwerer dissoziierenden Säurebestandteilen kann eine hohe Titrationsacidität mit einer relativ niedrigen Ionenacidität einhergehen und umgekehrt.

Die Messung der Harnacidität.

Theoretisch sind die beiden Harnaciditäten ganz scharf fixiert; dagegen kann die praktische Ausführung aus einer ganzen Anzahl von Gründen bis jetzt nur näherungsweise richtige Werte liefern. Ein Teil der Fehlerquellen ergiebt sich aus physikochemischen Erörterungen.

1. Die Titrationsacidität. — Angenommen, von den Nieren aus gelangte zur Ausscheidung nur Wasser, Na^+ und $H_2PO_4^-$; nach der Ausscheidung dissoziiert dann, wie schon gesagt, in der wässerigen Lösung $H_2PO_4^-$ zum Teil in H^+ und $HPO_4^{=}$. Die Titrationsacidität sollte in diesem einfachsten Fall durch die Menge von starker Lauge (z. B. Natronlauge) bestimmt sein, die die aktuellen und potentiellen H^+-Ionen der Säure $H^+HPO_4^{=}$ bindet, die also alles bei der Säuerung des Blutes entstandene $H_2PO_4^-$ wieder in $HPO_4^{=}$ überführt; der Neutralpunkt $c_H = c_{OH} = 0{,}8 \cdot 10^{-7}$ müfste nach dem Laugenzusatz erreicht sein.

Zunächst: wie ist dieser Neutralpunkt zu erkennen? Bekanntlich benutzt man dazu die Indikatoren; das sind nach Ostwald im allgemeinen sehr schwache Säuren, deren Anionen eine andere Farbe haben, als ihre neutralen Moleküle; das Anion des Phenolphtaleins ist rot, das Molekül farblos, das Anion des Methylorange gelb, das Molekül rot, u. s. w. Für jede der Säuren giebt es ein Gleichgewicht zwischen den Ionen H^+ und R^- und dem Molekül HR, derart dafs $\frac{c_H \cdot c_R}{c_{HR}} = k$ ist. Aus dieser Gleichung folgt, dafs ein Zusatz von H^+ zu einer Indikatorlösung um so mehr das Gleichgewicht zu Gunsten der Moleküle HR und auf Kosten der Anionen R^- verschieben mufs, je kleiner das Ionenprodukt $c_H \cdot c_R$ von vornherein ist; ein Indikator ist also in seiner Farbe um so empfindlicher gegen H^+, je schwächer er dissoziiert ist. Nun ist von den üblichen Indikatoren das Phenolphtalein die schwächste Säure; selbst in reinem Wasser, also bei einer Konzentration $c_H = 0{,}8 \cdot 10^{-7}$, ist die Konzentration c_R nicht grofs genug, um die Lösung rötlich erscheinen zu lassen, sondern erst wenn im Wasser c_{OH} eine Spur über c_H überwiegt, erst dann kann freies rotes R^- in merklichen Mengen auftreten. Danach ist es selbstverständlich, dafs man bei der Bestimmung der Titrationsacidität des Harns, wo es darauf ankommt, Lauge so lange zum Harn zuzusetzen, bis c_H auf den minimalen Wert von $0{,}8 \cdot 10^{-7}$ herabgedrückt ist, Phenolphtalein verwendet. Denn die anderen Indikatoren, wie Methylorange, Rosolsäure, Kochenille, Alizarinrot u. a., sind Säuren von höherer Acidität als Phenolphtalein und zeigen deshalb bereits die Ionenfarbe oder eine Mischung von Ionen- und Molekülfarbe, wenn c_H sich noch ein Stück weit oberhalb des Wertes $0{,}8 \cdot 10^{-7}$ befindet, wenn also die Lösung noch sauer ist. Mit Recht wird darum neuerdings Phenolphtalein angelegentlichst zur Aciditätsmessung

des Harns empfohlen*); nur wäre es nicht nötig gewesen, seine Vorzüge erst durch langwierige Versuche nachzuweisen.

Wenn man nun unter Verwendung von Phenolphtalein eine Lösung, die $H_2PO_4^-$ enthält, mit Lauge titriert, so ist nachweislich noch nicht alles $H_2PO_4^-$ in $HPO_4^=$ übergeführt, wenn der Neutralpunkt erreicht ist. $H_2PO_4^-$ ist nämlich eine recht schwache Säure, die sich in gewissem Maſse etwa wie das Phenolphtalein verhält. Dieses bildet seine roten Anionen nur dann, wenn ein kleiner Zusatz von OH^- zum neutralen Wasser dessen normalen H^+-Gehalt etwas herabgemindert hat; ähnlich ist auch wenigstens eine vollständige Dissoziation der schwachen Säure $H_2PO_4^-$ nicht möglich in Gegenwart von $0{,}8 \cdot 10^{-7}$ g H^+ pro Liter, nicht einmal ein Überschuſs von OH^- bringt die Moleküle $H_2PO_4^-$ zum Verschwinden. Denn das geht deutlich aus der bekannten Erscheinung hervor, daſs bei Auflösung von reinem Na_2HPO_4 in Wasser durch „hydrolytische Reaktion“ die $HPO_4^=$-Ionen sich mit den H^+-Ionen des Wassers zu $H_2PO_4^-$ vereinen, woraus ein Überwiegen an OH^- in der Lösung, eine Alkalescenz resultiert. Wäre $H_2PO_4^-$ eine starke und nicht eine schwache Säure, zerfiele es also leicht in die Ionen H^+ und $HPO_4^=$, dann wäre die Lösung von Na_2HPO_4 neutral; und der Harn wäre neutral, nachdem ihm die dem $H_2PO_4^-$ äquivalente Menge $NaOH$ zugesetzt wäre. In Wirklichkeit aber ist er dann schwach alkalisch.

Neutralpunkt, Moment des äquivalenten Zusatzes von Lauge und Moment des völligen Verbrauchs der potentiellen H^+-Ionen der Säure $H_2PO_4^-$ sind also nicht, wie wir eigentlich (S. 527) voraussetzten, identisch; denn nach dem Zusatze der der $H_2PO_4^-$-Menge äquivalenten Lauge ist der Neutralpunkt schon überschritten, und die Umwandlung von $H_2PO_4^-$ in $HPO_4^=$ unter Verlust von H^+ ist noch nicht erreicht. Wie weit soll nun titriert werden? — Wenn wir die Lösung von $Na^+H_2PO_4^-$ mit dem Harn identifizieren — was wir in Anbetracht der ähnlichen Dissoziationsverhältnisse bei den anderen für die Harnacidität maſsgebenden Elektrolyten ruhig thun dürfen —, so muſs nach allem, was über die Art des Zustandekommens der Harnacidität gesagt ist, es als das Ziel von deren Messung gelten, die den Säureanteilen äquivalente Lauge zu ermitteln. Das hieſse also, einen gewissen Grad von Alkalescenz, eine gewisse schwache Rötung mit Phenolphtalein herstellen. Das ist aber wegen der

*) Nägeli, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 313 (1900).



wechselnden Eigenfarbe des Harns technisch undurchführbar. Also mufs man auf einen der zwei anderen Punkte titrieren, selbstverständlich auf den leicht einstellbaren und dem Äquivalenzpunkt sehr nahen Neutralpunkt. Man begeht nur einen kleinen Fehler, wenn man ihn als Endpunkt der Titration wählt; die Acidität wird ein wenig zu niedrig bestimmt.

Damit sage ich natürlich gar nichts Neues, sondern beschreibe nur möglichst genau, wie man zu dem Aciditätsminus auf Grund der Dissoziationsgleichgewichte der einzelnen Phosphationen und ihrer gegenseitigen Umwandlungsfähigkeit kommt. Und zwar thue ich das mit deshalb, weil man sich von diesen und ähnlichen Vorgängen gewöhnlich ungenügend Rechenschaft giebt, vielmehr die primären und sekundären Phosphate sehr häufig wie stabile Verbindungen ansieht, während doch sie oder besser ihre Ionen im Gegenteil aufserordentlich veränderlich sind. Darum kann man auch nicht, wenn man den H_2PO_4-Gehalt des Harnes für seine Acidität für mafsgebend ansieht, diese dadurch zu bestimmen suchen, dafs man Kationen zum Harn zusetzt, die mit dem $H_2PO_4^-$ einen unlöslichen Niederschlag geben. Denn es ist eine Unmöglichkeit, eine Art Phosphationen gerade in der Menge, in der sie im unveränderten Harn enthalten ist, für sich auszufällen und die andere für sich zurückzulassen, ebenso wenig wie man die Wasserstoffionen einer partiell dissoziierten Säure mit OH^- wegtitrieren und den undissoziierten Bestand von Säuremolekülen dabei völlig intakt lassen kann. Und was für die Phosphationen gilt, gilt für alle übrigen Ionen des Harns genau so; deshalb sind die Verfahren von Maly, von Lieblein und Freund, von de Jager, die mit Fällungsmitteln hantieren, von vornherein verfehlt.

Noch in anderen Punkten, freilich nicht sehr belangreichen, spielen die Dissoziationsgleichgewichte für die Titration des Harns eine Rolle. Ich erwähne auch diese Punkte im wesentlichen nur, um nachdrücklich bemerkbar zu machen, was für ein labiles Gebilde eigentlich eine jede organische Flüssigkeit ist.

Das vorher genannte Aciditätsminus, das von der Hydrolyse der $HPO_4^=$-Ionen herrührt, kann nicht einmal einen konstanten Fehler bei der Titration bedeuten. Denn sowohl die Praxis wie die Theorie lehren, dafs die Hydrolyse, also die Umkehrung der mit der Titration angestrebten Reaktion $OH^- + H_2PO_4^- \longrightarrow HOH + HPO_4^=$, um so stärker ist, je verdünnter die Lösung. Um so stärker ferner, je höher die Temperatur. Was bisher für die Umwandlung von $H_2PO_4^-$ in $HPO_4^=$ gesagt ist, läfst sich Wort für

Wort auf die Umwandlung von H_2CO_3 in HCO_3^- übertragen, und gerade von HCO_3^--Lösungen ist bekannt, dafs sie bei Zimmertemperatur Phenolphtalein röten, bei Eistemperatur nicht, weil die Hydrolyse $HCO_3^- + HOH \rightarrow H_2CO_3 + OH^-$ bei höherer Temperatur wegen der erheblicheren Dissoziation des Wassers und des Bikarbonats merklich, bei niederer unmerklich ist. Das Resultat der Titration des Harns, welcher Phosphate und Karbonate enthält, mufs also von Verdünnung und Versuchstemperatur abhängen; das bedeutet eine neue Erweiterung der Fehlergrenze.

Dann kommt noch eins in Betracht. Wenn im Verlauf der Titration mehr und mehr $HPO^{4=}$ auf Kosten des $H_2PO_4^-$ entsteht, so bildet sich mit den Na-Ionen auch etwas undissoziiertes Salz Na_2HPO_4, dessen Menge durch ein Gleichgewicht $k = \frac{c^2_{Na} \cdot c_{HPO_4}}{c_{Na_2HPO_4}}$ definiert sein mag. Neben $H_2PO_4^=$ und Na^+ wird nun von den Nieren stets noch in wechselnden Mengen Cl^- und Na^+ abgeschieden; das Gleichgewicht $\frac{c^2_{Na} \cdot c_{HPO_4}}{c_{Na_2HPO_4}}$ und damit die Konzentration an $HPO_4^=$ mufs deshalb mit bestimmt sein vom Kochsalzgehalt des Harns; je gröfser dieser, um so weniger $HPO_4^=$, je kleiner, um so mehr. Von der Konzentration des $HPO_4^=$ hängt aber, wie wir sahen, dessen Hydrolyse ab und damit auch der Neutralisationspunkt. Dieser Überlegung entspricht die Thatsache, dafs wenigstens bei niederer Temperatur eine Lösung von Na_2HPO_4 Phenolphtalein nicht rötet, wenn ein starker Kochsalzüberschufs zugegen ist. Also auch vom Kochsalzgehalt des Harns mufs dessen Titrationsacidität abhängig sein.

Neben diesen und einigen weiteren, auf andere Ionen bezüglichen Fehlerquellen, die für das Titrationsverfahren aus der komplizierten physikochemischen Beschaffenheit des Harns resultieren, spielt eine grofse Rolle dann noch eine, die Eigenfarbe des Harns, die die Erkennung des Indikatorfarbenumschlages so sehr erschwert. Es scheint mir ziemlich sichergestellt, dafs die Ungenauigkeit des Titrationsverfahrens, die in einer Fehlergrenze von mehreren Prozenten zum Ausdruck kommt, vor allem diesem Moment zur Last fällt, da eine ausgiebige Verdünnung des Harns mit Wasser keinen namhaften Einflufs auf das Titrationsergebnis zu haben scheint. Gerade wegen der Eigenfarbe hat man sich auch auf andere Aciditätsmethoden besonnen und hat ihren Einflufs in den verschiedenen Fällungsverfahren, bei denen Sulfat- oder Phosphatniederschläge erzeugt werden, die den Farbstoff zum Teil nieder-

reifsen, wohl auch zu eliminieren versucht. Aber wenn auch die vorausgehenden Betrachtungen, wie ich schon sagte, auf relativ unbedeutende Fehler der Titriermethode die Aufmerksamkeit lenken, und wenn sie vielleicht nicht viel Neues enthalten, vielmehr im wesentlichen nur alte, schwer verständliche Lehrsätze in die klare Ionensprache übertragen, so können sie doch wenigstens den Sinn haben, allgemeinbegreiflich zu machen, dafs, wo man auch am Harn — und noch viel mehr gilt das wohl fürs Blut — einen chemischen Hebel ansetzt, man das ganze System ins Rollen bringt, dafs es keine Änderung, kein Herausnehmen und kein Hinzufügen giebt, ohne dafs alle Verhältnisse sich ändern. Allerdings je nach dem Eingriff in verschiedenem Mafse. Dafs dieser Eingriff bedeutend sein mufs in den Fällungsverfahren, wäre leicht noch deutlicher zu zeigen, als es hier geschah; dafs er relativ wenig Bedeutung hat für das Resultat der einfachen Titration mit Lauge, dürfte wohl aus dem Gesagten hervorgehen. Die Titration mit Phenolphtalein bis zum Neutralpunkt halte ich also für ein ganz brauchbares Verfahren.

2. Die Ionenacidität. — Zur Messung der Wasserstoffionen-Konzentration des Blutes habe ich vor einiger Zeit eine elektrometrische Methode vorgeschlagen *), die, wie ich damals am Schlufs meiner Publikation aussprach, sich auch zur Messung der Harnacidität eignet; in einer Kette von der Anordnung Wasserstoff | Salzsäure | Harn | Wasserstoff wird die Konzentration an H^+-Ionen im Harn bekannt, wenn Konzentration und Dissoziationsgrad der Salzsäure, die elektromotorische Kraft der Kette und das Berührungspotential zwischen Säure und Harn bestimmbar sind. v. Rhorer **) und ich ***) haben nach diesem Prinzip Bestimmungen der Ionenacidität des Harns ausgeführt, die zu ungefähr dem gleichen Ergebnis geführt haben, obgleich die Definierung des Berührungspotentials Salzsäure | Harn auf verschiedenem Wege erreicht wurde. Ich suchte die Unbekannte des Potentials dadurch aus der Gleichung für die Acidität wegzuschaffen, dafs ich zwischen Salzsäure und Harn eine Kochsalzlösung einschob, die die gleiche Leitfähigkeit hat wie der Harn, von der Annahme ausgehend, dafs elektrochemisch die Elektrolyte des Harns sich annähernd genau so verhalten wie eine Kochsalzlösung, dafs also zwischen Harn

*) Pflügers Archiv **81**, 522 (1900).
) Ebenda **86, 586 (1901).
***) Physikal. Chem. der Zelle u. der Gewebe 1902, S. 248 bis 251.

und einer Kochsalzlösung von gleichem Widerstand das Potential Null besteht; durch diese Einschiebung bildet sich zwar ein neues Berührungspotential zwischen Salzsäure und Kochsalz; dessen Wert ist aber leicht zu berechnen, wenn HCl-Lösung und NaCl-Lösung in Bezug auf Ionen gleich konzentriert, „isohydrisch“ sind. v. Rhorer brachte das Berührungspotential Salzsäure | Harn dadurch annähernd auf Null, dafs er zu einer $\frac{1}{100}$- oder $\frac{1}{1000}$-norm. Salzsäure Kochsalz in einer Konzentration zufügte, die mit dem als Norm angenommenen mittleren Kochsalzgehalt des Harns von 0,2-norm. identisch war, und diese HCl-NaCl-Mischung direkt an den Harn angrenzen liefs. Versuche von Bugarszky und theoretische Erörterungen von Abegg und Bose ergeben, dafs dann das Berührungspotential praktisch zu vernachlässigen ist, auch wenn der Kochsalzgehalt des Harns nicht ganz genau einer 0,2-norm. Lösung entspricht.

Meine Methode ist zweifellos die kompliziertere, weil für jeden Versuch die Leitfähigkeitsbestimmung am Harn, die Anfertigung einer gleich leitenden Kochsalzlösung, einer isohydrischen Salzsäurelösung und eine Ermittelung des Dissoziationsgrades der Salzsäure nötig ist, während v. Rhorer für alle Versuche mit derselben Lösung von $\frac{1}{100}$- oder $\frac{1}{1000}$-norm. HCl + 0,2-norm. NaCl auskommt, in der die Salzsäure als völlig dissoziiert angesehen werden kann. Trotzdem möchte ich meiner Methode den Vorzug geben, wenigstens wenn sie für die Untersuchung aller möglichen atypischen und pathologischen Harne angewendet werden soll. Denn wenn infolge von Stauung im Kreislauf oder bei Nephritis, Diurese, Diabetes der Kochsalzgehalt des Harns sehr erheblich von dem Mittelwert 0,2-norm. abweicht, so ist, wie die Rechnung leicht ergiebt, das Berührungspotential zwischen Harn und $\frac{1}{1000}$-HCl + 0,2-NaCl doch nicht mehr einfach zu vernachlässigen; zwischen einer 0,2-norm. NaCl-Lösung und einer 0,01-norm. (= 0,058 Proz.) beträgt es bereits 0,014 Volt, und bei Ketten, die überhaupt nur etwa 0,2 Volt Spannung haben, ist das schon ein erheblicher Bruchteil der ganzen elektromotorischen Kraft.

Beiden Methoden haftet ein Fehler an, der allen Gasketten anhaftet; ihre elektromotorische Kraft ist nicht ganz konstant. Schwankungen um $\pm$ 0,003 Volt in maximo kommen immer vor*).

*) Siehe darüber v. Rhorer, S. 593.

Wieviel dies für die Ionenacidität ausmacht, werde ich noch zeigen. Kleine Ungenauigkeiten sind auch sonst noch möglich; bei meiner Anordnung H_2 | HCl | NaCl | Harn | H_2 resultieren sie teils aus manchmal nicht ganz vollkommener Übereinstimmung in der Leitfähigkeit des Harns und der NaCl-Lösung, und teils aus kleinen Fehlern in der Beurteilung der HCl-Dissoziation, welche an Hand einer Kurve der Werte von $\frac{\mu_v}{\mu\,\infty}$ für HCl geschah, die aus Kohlrauschs bekannten Messungen der molekularen Leitfähigkeiten abgeleitet war. Ob diese Fehler viel ausmachen, soll ebenfalls noch erörtert werden.

Vergleich der Titrations- und Ionenacidität von normalen und pathologischen Harnen.

Um ein paar weitere Anhaltspunkte über den Wert der Aciditätsbestimmungen nach den beiden Methoden, zumal auch für die Untersuchung pathologischer Harne zu gewinnen, veranlaſste ich Herrn P. Jankowsky, einige Messungen auszuführen. Die Titration geschah mit 0,1-norm. NaOH und Phenolphtalein, die Bestimmung der elektromotorischen Kraft mit dem von mir für Blutalkalescenzmessungen angegebenen Apparat*). Wenn man einen schwachen Wasserstoffstrom etwa 5 Minuten lang durch seine beiden Gefäſse hindurchleitet und dann die Elektrodenräume gegen die Atmosphäre vollständig durch Quecksilberventile abschlieſst, so stellt sich innerhalb 3 bis 5 Stunden ein konstanter Wert für die elektromotorische Kraft π ein, und die Ionenacidität ist dann zu berechnen aus der Gleichung:

$$\pi = 0{,}0575 \log \frac{\alpha \,.\, c_{HCl}}{x} - 0{,}031,$$

in der c_{HCl} die Normalität der Salzsäure, α ihren Dissoziationsgrad, x die Ionenacidität und 0,031 das Berührungspotential zwischen der Salzsäure und der isohydrischen NaCl-Lösung bedeutet.

Ein Beispiel soll zunächst den Versuchsgang und die Fehlergrenzen deutlich machen:

Versuch 70: Kette: H_2 | 0,382 HCl | 0,40 NaCl | Harn | H_2
Spezif. Leitfähigkeit des Harns bei $t = 25°$: $\lambda = 38{,}73 \,.\, 10^{-3}$
" " von 0,4 NaCl bei $t = 25°$: $\lambda = 42{,}86 \,.\, 10^{-3}$

*) Physikal. Chem. der Zelle u. der Gewebe, S. 240.

Zeit	π	$c_H \cdot 10^5$	$[c_H \cdot 10^5]$
11 h	Beginn		
2 „	0,2488	0,443	0,416
3 „	0,2478	0,460	0,433
5 „	0,2441	0,533	0,501
6 „	0,2477	0,463	0,436

Die Konstanz der π-Werte in dem gewählten Beispiel ist so schlecht wie sehr selten, die Schwankungen übersteigen 4 Millivolt. Dementsprechend variiert die berechnete Ionenacidität c_H zwischen $0{,}44 \cdot 10^{-5}$ und $0{,}53 \cdot 10^{-5}$. Die Werte unter $c_H \cdot 10^5$ sind berechnet auf Grund der Annahme, dafs in der 0,382-norm. HCl die Säure zu 85 Proz. dissoziiert ist. Wäre diese Annahme falsch, und beträfe die Dissoziation nur 80 Proz. der Moleküle, wäre also ein Fehler von 5 Proz. gemacht, was in Wirklichkeit kaum vorkommen kann, so ergäben sich für die Acidität die in der Rubrik $[c_H \cdot 10^5]$ angegebenen Werte.

Die verzeichneten Schwankungen könnten erheblich erscheinen, wenn nicht die weiterhin mitgeteilten Resultate zeigen würden, dafs in der Ionenacidität des normalen und noch mehr mancher pathologischer Harne starke Variationen, und zwar um das Zehnfache und mehr eines bestimmten Wertes vorkommen, denen gegenüber die kleinen Schwankungen, die das Resultat von Fehlern der Methode sein können, keine besondere Bedeutung beanspruchen. —

In den folgenden Tabellen der Mefsresultate bedeutet c_H die Ionenacidität, t die Titrationsacidität, λ die spezifische Leitfähigkeit des Harns. Die c_H-Werte sind im allgemeinen in eine absteigende Reihe gebracht, um übersichtlich darzustellen, ob mit den t- und λ-Werten ein Parallelismus vorhanden ist. In den meisten Fällen wurde der Harn des letzten Tages untersucht; innerhalb von 24 Stunden verändert sich bei Aufbewahrung im kühlen Raum weder die Titrations- noch die Ionenacidität. Vom normalen Harn wurden meistens Morgen- und Abendportionen gesondert untersucht.

Aus der Tabelle (siehe S. 539) ergiebt sich, 1. dafs die c_H-Werte weit stärker variieren als die t-Werte (c_H Maximum 1,00, Minimum 0,047; t Maximum 0,075, Minimum 0,018); dieser Erscheinung werden wir immer wieder begegnen;

2. dafs, wie als möglich, wenn auch nicht als nötig vorausgesehen werden konnte (siehe S. 530), zwischen c_H und t keine

Normaler Harn.

Versuchs-Nr.	Bemerkungen	$c_H \cdot 10^5$	t	$\lambda \cdot 10^3$
50	Abendharne	0,83	0,039	17,43
28		0,61	0,052	29,34
55		0,13	0,025	26,52
26		0,12	0,025	26,10
52		0,047	0,028	29,75
63	Abendharn. Über Tag keine Flüssigkeit	0,23	0,028	41,30
51	Morgenharne vor dem Frühstück	0,58	0,046	17,34
29		0,52	0,034	26,96
27		0,50	0,042	27,90
53		0,46	0,069	28,05
56		0,31	0,075	24,41
25	Morgenharne nach dem Frühstück	1,00	0,039	27,30
1		0,87	0,018	15,74
24		0,68	0,047	27,02

direkte Beziehung besteht; hierin weichen Jankowskys Resultate von denen v. Rhorers ab;

3. dafs weder c_H noch t in deutlicher Abhängigkeit von λ steht.

Harn von Nierenkranken.

Versuchs-Nr.	Bemerkungen		$c_H \cdot 10^5$	t	$\lambda \cdot 10^3$	Weitere Bemerkungen
2	Nephritis interstitialis Etwa 4 Wochen nach einer Urämie zuerst untersucht.	28. Sept.	2,34	0,019	10,12	Prom. 1 Eiweifs. Menge: 1300 ccm
6		1. Okt.	1,50	0,018	12,08	2 " " 2300 "
13		6. "	0,84	0,027	10,94	1,75 " " 2000 "
17		8. "	1,10	0,020	10,73	1,75 " " 1600 "
23		14. "	0,86	0,019	11,04	1,75 " " 1400 "
49	Nephritis acuta	26. Nov.	2,20	0,022	9,20	4 " " 1800 "
54		29. "	2,10	0,020	9,01	3 " " 3100 "
59		3. Dez.	2,10	0,022	9,54	2,5 " " 3400 "
60	Scharlach-nephritis	4. Dez.	0,66	0,052	12,64	
62		5. "	0,66	0,052	12,77	
4	Nephritis interstitial. chronica	30. Sept.	0,56	0,014	11,28	
5		1. Okt.	0,67	0,030	17,15	0,5 Eiweifs. Menge: 1200 ccm
7	Nephritis haemorrhagica chronica		0,13	0,011	16,4	Menge: 1800 ccm

Diese Tabelle zeigt vielleicht am deutlichsten, dafs jede der beiden Aciditätsmethoden ihre Berechtigung und ihren eigenen Wert besitzt. Soviel ich weifs, gelten die titrimetrisch bei nephriti-

schen Harnen gefundenen Werte nicht als besonders pathognomonisch charakterisiert. Von den hier angegebenen Titrationszahlen könnte man höchstens sagen, dafs sie wenigstens bei dem Fall der urämischen Nephritis und der Nephritis acuta durchweg und gleichförmig niedrig sind. Um so auffälliger ist es, dafs die Ionenacidität oft so hoch ist, wie sie beim normalen Harn bisher nicht gefunden wurde. Unter den 14 normalen Werten kommt ein Wert $1{,}00 . 10^{-5}$ und zwei über $0{,}8 . 10^{-5}$ vor; unter den 6 Werten, die ich früher*) angegeben habe, ist der höchste $0{,}6 . 10^{-5}$; v. Rhorers Maximalwert ist $0{,}76 . 10^{-5}$. Bei der urämischen Nephritis und bei der Nephritis acuta ist die Acidität aber stets höher als $0{,}8 . 10^{-5}$ und erreicht einmal den Wert $2{,}34 . 10^{-5}$. Nachfragen über die Therapie bei diesen Krankheiten ergaben keine Anhaltspunkte für die hohe Acidität.

Auffällig in der Tabelle sind ferner die fast durchgehends niedrigen Werte für λ. Das steht sicherlich in Zusammenhang mit der bekannten sehr geringen molekularen Konzentration des Harns bei Nierenerkrankungen, mit der „Hyposthenurie“ v. Korányis, und ist auch neulich von Steyrer**) an einer Anzahl von Kranken konstatiert worden. Man kann daran denken, dafs von diesem geringen Elektrolytgehalt des Harns seine grofse Ionenacidität abhängt, dafs nicht die genügende Anzahl Na^+-Ionen anwesend ist, um die Dissoziation der sauren Natriumsalze ausgiebig zurückzudrängen; vielleicht gelangen aber auch während der Nephritis andere saure Bestandteile oder die gewöhnlichen in anderen Verhältnissen zur Ausscheidung.

Ein deutlicher Parallelismus zwischen c_H und t ist wiederum nicht zu bemerken.

Harn von Fiebernden:

Versuchs-Nr.	$c_H . 10^5$	t	$\lambda . 10^3$	Bemerkungen.
60	0,66	0,052	12,64	Scharlach 4. Dez., morgens 38°.
62	0,66	0,052	12,77	„ 5. „
12	0,49	0,050	20,69	Sepsis.
11 16	0,41	0,036	12,47	Typhus abdom. abends 39,7°, morgens 39,3°. Menge 900 ccm, 1,25 Prom. Eiweifs.
11	0,29	0,039	12,42	Pleuropneumonia fibrinosa, abends 38,3°, morgens 39,0. Menge 100 ccm. 0,25 Prom. Eiweifs.
21	0,26	0,040	18,16	Typhus abdom. 1,5 Prom. Eiweifs, 39,6°.
61	0,18	0,042	14,24	„ „ morgens 38,6°.
8	0,18	0,046	23,08	Sepsis. 38,9°.

*) Physikal. Chem. der Zelle u. der Gewebe, S. 250.

**) Diese Beiträge 2, 312 (1902).

Weder die c_H- noch die t-Werte sind besonders hoch. Für die t-Werte ist das auffallend, da im allgemeinen im Fieber die Acidität erhöht ist. Ein Parallelismus zwischen c_H, t und λ besteht nicht.

Harn bei verschiedenen Krankheiten.

Versuchs-Nr.	$c_H \cdot 10^5$	t	$\lambda \cdot 10^3$	Bemerkungen
10	0,71	0,025	12,22	Insufficientia cordis. Menge 200 ccm.
15	0,45	0,037	18,39	Tetanus. Am vorhergehenden Tage Krämpfe.
57	0,38	0,017	17,83	Insuffic. mitralis. Starke Diurese. Menge 2400 ccm.
18	0,35	0,013	13,02	„ „ Menge 2400 ccm.
66	0,33	0,030	9,99	Carcinoma ventric. mit Anacidität d. Magensafts.
22	0,32	0,020	17,72	Diabetes mellitus 14. Okt. 2,2 Proz. Zucker.
46	0,27	0,023	20,17	„ „ 21. Nov. 0,7 „ „
19	0,24	0,022	17,36	„ „ 10. Okt. 2,2 „ „
14	0,19	0,011	17,73	Insuffic. mitralis. Starke Diurese. Menge 3600 ccm.
65	0,028	0,009	16,58	„ „ „ „
20	0,019	0,014	11,49	Insuffic. cordis. Menge 600 ccm. 5 Prom. Eiweifs.
9	0,0015	0,005	12,0	Insuffic. mitralis. Menge 4600 ccm.

Auch hier zeigen sich c_H-, t- und λ-Werte voneinander unabhängig, wie ja bisher überhaupt. Aber notwendig ist dieses gegenseitige Verhältnis nicht. Das beweist z. B. der parallele Gang von c_H und t beim Kaninchen unter dem Einflufs des Hungers:

Harn vom hungernden Kaninchen.

Versuchs-Nr.	Bemerkungen	$c_H \cdot 10^5$	t	$\lambda \cdot 10^4$
30	Gefüttert	0,00007	— 0,03	39,80
31	2 Tage Hunger	0,00087	0	12,62
32	3 „ „	0,094	+ 0,045	13,35
35	1 Tag „	0,00026	— 0,04	16,89
36	3 Tage „	0,27	+ 0,066	11,80
37	5 „ „	1,9	+ 0,098	14,07

Zusammenfassung.

Der Begriff der Acidität des Harns hat zweierlei Bedeutung; entweder man versteht darunter die Menge von dissoziiertem und undissoziiertem Wasserstoff pro Liter, die an Hydroxyl gebunden werden mufs, damit der Harn neutral wird, oder man versteht nur die Konzentration des dissoziierten Wasserstoffs darunter. Es läfst

sich theoretisch ableiten, dafs die beiden Aciditäten, die „Titrationsacidität“ und die „Ionenacidität“, voneinander unabhängige Gröfsen sein können, so dafs von zwei Methoden zu ihrer Bestimmung jede ihre selbständige Bedeutung haben müfste. Experimente zeigen, dafs wirklich häufig, vielleicht in den meisten Fällen, kein Parallelismus zwischen den Ergebnissen beider Verfahren existiert. Wenn also die Messung der Acidität des Harns überhaupt von wesentlichem Nutzen für die Beurteilung von besonderen Sekretionszuständen der Nieren oder eigentümlichen Verhältnissen im Stoffwechsel ist, so kann die eine Methode so gut von Wert sein wie die andere. Die wenigen orientierenden Versuche, die zum Vergleich der beiden Aciditäten angestellt wurden, zeigen denn auch, dafs die Ionenacidität anormal sein kann, wo die Titrationsacidität es nicht ist.

XXXI.

Über die Gerinnung der Muskeleiweifskörper und deren mutmafsliche Beziehung zur Totenstarre.

Von Dr. **Otto von Fürth**, Privatdozent und Assistent am physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Die vorliegende Mitteilung bildet eine Fortsetzung älterer Untersuchungen des Verfassers, welche die Eiweifskörper des Muskelplasmas und deren Gerinnungserscheinungen zum Gegenstand hatten*).

Bekanntlich gehört das Problem der Totenstarre zu den meist umstrittenen der Physiologie. Seitdem Kühne die spontane Gerinnbarkeit des Muskelplasmas entdeckt und mit den Erscheinungen der Leichenstarre in Zusammenhang gebracht hat, war die Frage, ob denn der Rigor mortis wirklich auf die Koagulation der Muskeleiweifskörper zurückgeführt werden könne, Gegenstand zahlreicher und umfassender Untersuchungen, deren Erörterung den Rahmen dieser Abhandlung weit überschreiten würde. Wenngleich gegenwärtig wohl die Mehrzahl der Physiologen zu der Kühneschen Auffassung hinneigen dürfte und die meisten Lehrbücher das Problem der Totenstarre in dem angegebenen Sinne erläutern, fehlt es auch jetzt nicht an Stimmen, welche schwerwiegende Argumente zu Gunsten der „Kontraktionstheorie“ geltend machen. So

---

*) 1. Über die Eiweifskörper des Muskelplasmas. Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **36**, 232—274. 2. Über die Einwirkung von Giften auf die Eiweifskörper des Muskelplasmas und ihre Beziehung zur Muskelstarre. Ebenda **37**, 389—412. 3. Über die Eiweifskörper der Kaltblütermuskeln und ihre Beziehung zur Wärmestarre. Zeitschr. f. physiol. Chemie **31**, 338 bis 352. 4. Zur Gewebschemie des Muskels. Ergebnisse der Physiologie. 1, 109—133.



ist, um nur ein Beispiel anzuführen, vor einiger Zeit **Modica***) auf Grund eingehender Untersuchungen zu der Überzeugung gelangt, die Totenstarre könne nicht als Effekt der Koagulation des Muskelplasmas angesehen werden; dieselbe sei vielmehr als eine Kontraktion von Muskelfibrillen aufzufassen, welche durch den Reiz gewisser postmortal im Muskel auftretender Substanzen ausgelöst werde. Es sei von vornherein hervorgehoben, dafs die im folgenden mitgeteilten Versuche keinen Anspruch erheben, eine Lösung der Frage in dem einen oder anderen Sinne herbeiführen zu wollen; dieselben sollen lediglich einige Ergebnisse objektiver Beobachtung dem weiteren Studium dieses Problems dienstbar machen.

1. Versuche zum Nachweise eines die Totenstarre auslösenden Fermentes.

Die Analogie in den Erscheinungen der Spontangerinnung der Eiweifskörper im Muskelplasma und im Blute brachte es mit sich, dafs die Erscheinungen der Totenstarre von jeher mit der Wirkung von Fermenten in Zusammenhang gebracht wurden. Diese Auffassung schien einen thatsächlichen Untergrund zu gewinnen, als Halliburton Beobachtungen über ein „Myosinferment“ veröffentlichte, d. h. über ein Enzym im Muskel, das befähigt sein sollte, Muskelplasma in ähnlicher Weise zur Gerinnung zu bringen, wie das Fibrinferment die Gerinnung des Blutes einleitet.

Da ich mich bei meinen älteren Versuchen von der Existenz dieses Fermentes nicht ausreichend hatte überzeugen können, schlug ich nunmehr einen anderen Weg zu seinem Nachweise ein.

War ein Ferment bei der Entstehung der Totenstarre beteiligt, so war zu erwarten, dafs Extrakte aus totenstarren Muskeln befähigt wären, bei Injektion in die Muskelgefäfse eines frisch getöteten Tieres den Eintritt der Totenstarre zu beschleunigen.

Die Erfahrung hat nun gelehrt, dafs die aseptische Autolyse vielfach die Möglichkeit bietet, Organen Fermente zu entziehen, die bei direkter Extraktion der Gewebe von den Organzellen beharrlich festgehalten werden. Dafs sich speziell in den Muskeln postmortale autolytische Vorgänge abspielen, ist bekanntlich schon von Salkowski und seinen Schülern sichergestellt worden, und es lag nahe, an die Möglichkeit zu denken, dafs vielleicht gerade

*) Le singole forme della rigidità muscolare nei cadaveri e loro cause. Bulletino d. R. Acc. med. Roma 24, Heft II. 1897—1898.

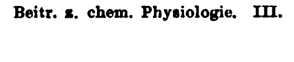
Prozesse der bezeichneten Art es wären, welche das hypothetische *Totenstarre-Ferment* erst in Freiheit setzen und aktionsfähig machen. Es ergab sich also zunächst die Frage, ob es möglich sei, aus autolysierten Muskeln ein die Totenstarre auslösendes Ferment zu extrahieren.

Die Technik der *Isolierung umfangreicherer Muskelpartieen zum Zwecke der aseptischen Autolyse* bedarf einiger erläuternder Bemerkungen. Die von *Conradi**) ausgearbeitete Methodik, die sich da, wo es sich um andere Organe und Gewebe handelte, vortrefflich bewährt hat, liefs in diesem speziellen Falle im Stich und zwar offenbar deshalb, weil die grofsen zerfaserten Schnittflächen der Muskeln eine Infektion aufserordentlich begünstigen. Nach zahlreichen vergeblichen Versuchen führte nachstehendes Verfahren zum Ziele:

Dem Rat des Herrn Prof. *Ernst Levy* folgend, ging ich derart vor, dafs ich einen sehr grofsen Klotz ganz frisch aus dem Schlachthause bezogenen Pferdefleisches zunächst für 5 Minuten in kochendes Wasser brachte, um sämtliche in die oberflächlichen Schichten eingedrungenen Keime zu zerstören. Mit Hülfe eines grofsen in kochendem Wasser sterilisierten und überdies unmittelbar vor dem Gebrauche ausgeglühten Messers und einer ebenso behandelten Pinzette wurde sodann der Klotz der Quere nach durchtrennt. Hierauf wurde aus dem Innern desselben eine Anzahl faustgrofser Würfel herausgeschnitten, jeder derselben sogleich für 3 bis 4 Minuten in kochendes Wasser und schliefslich aus diesem in ein sterilisiertes, luftdicht verschliefsbares Blechgefäfs übertragen. Bei dieser Prozedur wurde das Gewebe nur im Bereiche einer etwa centimeterbreiten Oberflächenzone koaguliert; das Innere der Fleischstücke blieb intakt und in der Regel wochenlang steril. Bei der jeweiligen Eröffnung der Gefäfse wurde sogleich eine bakteriologische Prüfung des Inhalts durch Impfung auf Agar-Agar und Bouillon vorgenommen.

Bei der unter Anwendung der beschriebenen Kautelen bei Brutofentemperatur sich vollziehenden aseptischen Autolyse des Muskelgewebes behält dasselbe lange Zeit eine ziemlich feste Konsistenz. Am Boden des Gefäfses pflegt sich eine geringe Menge einer blutig gefärbten Flüssigkeit anzusammeln. Die Muskelstücke besitzen nur einen schwachen fettsäureartigen, niemals aber käsigen Geruch. In allen jenen Fällen, wo ein solcher Geruch, sowie eine hochgradige Auflockerung und Neigung zum Zerfalle in Fibrillen sich bemerkbar machte, ergab die bakteriologische Untersuchung die erfolgte Infektion. Dafs eine sorgfältige Untersuchung in dieser Richtung bei ähnlichen Versuchen unumgänglich notwendig ist und dafs man sich keineswegs auf die Geruchsprüfung verlassen darf, ergiebt sich aus der wiederholten Beobachtung, dafs auch Fleischstücke, die selbst nach längerem Verweilen

*) H. *Conradi*, Über die Beziehung der Autolyse zur Blutgerinnung. (Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.) Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 1, 144 ff.



im Brutschranke nahezu geruchlos geblieben waren, grofse Mengen von Mikroorganismen enthielten.

Ich stellte nun einige Versuche folgendermafsen an: Das dem sterilen Gefäfse entnommene Fleischstück wurde zerkleinert, mit Quarzsand unter Zusatz physiologischer Kochsalzlösung verrieben und die filtrierte und eventuell neutralisierte Flüssigkeit (etwa 50 ccm) in die Arteria femoralis eines frisch getöteten Hundes oder Kaninchens injiziert, während in die Schenkelarterie der anderen Seite die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung eingeführt wurde. In dem einen oder dem anderen Versuche beobachtete ich eine merkliche Beschleunigung des Eintritts der Totenstarre in dem mit der Autodigestionsflüssigkeit injizierten Schenkel und glaubte daher bereits auf eine Bestätigung der oben geäufserten Vermutung rechnen zu können. Einige weitere Versuche aber, die in der Art ausgeführt wurden, dafs ich die zu prüfende Flüssigkeit in zwei gleiche Hälften teilte und die eine Portion im nativen Zustande, die andere jedoch nach vorausgegangenem Aufkochen in die beiden Arteriae femorales desselben Tieres injizierte, fielen durchweg negativ aus und ergaben keinerlei Anhaltspunkte für die Annahme eines „Totenstarrefermentes“.

Da manche Gewebsfermente angeblich erst bei Anwendung eines sehr starken mechanischen Druckes den Zellen entzogen werden können, prefste ich in einem Falle das autolysierte Muskelgewebe nach sorgfältigem Verreiben mit Quarzsand unter Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung mit Hülfe einer Buchnerschen Presse aus, deren Benutzung mir in gütiger Weise von dem Direktor des hygienisch-bakteriologischen Instituts, Herrn Prof. Forster, gestattet worden war. Doch auch dieser Versuch fiel negativ aus.

Die bekannte Beobachtung, dafs sich die Totenstarre bei Tieren, die unter heftigen Krämpfen zugrunde gegangen sind, besonders schnell und intensiv entwickelt, legte den Gedanken nahe, dafs sich vielleicht unter diesen Verhältnissen eine reichlichere Bildung des gesuchten Fermentes vollziehe. Ich führte daher einen Versuch in der Weise aus, dafs ich ein Kaninchen mit Strychnin vergiftete. Nachdem das Tier unter heftigen Krämpfen zugrunde gegangen und seine Muskulatur schnell totenstarr geworden war, wurde dieselbe zerkleinert, mit Quarzsand verrieben und ohne Zusatz einer Extraktionsflüssigkeit in der Buchnerschen Presse unter Anwendung eines Druckes von 200 Atmosphären ausgeprefst. 40 ccm von dem so erhaltenen höchst konzentrierten Prefssafte wurden

in die rechte Schenkelarterie eines frisch getöteten Kaninchens injiziert. Gleichzeitig liefs ich die gleiche Menge physiologischer Kochsalzlösung in die linke Arteria femoralis einströmen. In beiden Extremitäten entwickelte sich die Starre fast gleichzeitig.

Versuche, von denen später die Rede sein soll, hatten ergeben, dafs sich in autolysierten Muskeln eine nicht zu der Kategorie der Fermente gehörige dialysable Substanz findet, welche die Spontangerinnung des Muskelplasmas in intensivster Weise hemmt. Man konnte daher daran denken, dafs dieses in die Muskelextrakte übergehende Agens möglicherweise die Wirkung eines gleichzeitig vorhandenen Totenstarrefermentes hemme bezw. verdecke. Die aus einem autolysierten Muskelstücke gewonnene Extraktionsflüssigkeit wurde daher zum Zwecke der Entfernung dieser gerinnungshemmenden Substanz gegen fliefsendes Wasser dialysiert, sodann durch Kochsalzzusatz wieder annähernd den Gewebssäften isotonisch gemacht und erst dann in die Schenkelarterie eines frisch getöteten Tieres injiziert. Doch auch hier war von einer Beschleunigung der Totenstarre nichts zu bemerken.

Ebenso wenig Erfolg erzielte ich, als ich die aseptische Autolyse durch die antiseptische ersetzte.

Hundemuskeln wurden vier Monate lang unter Toluolwasser bei Brutofentemperatur gehalten. Die abgegossene Flüssigkeit wurde in einem sterilisierten Scheidetrichter vom überstehenden Toluol befreit, sodann in eine sterilisierte Schale übertragen und darin im Vakuum über Schwefelsäure bei Zimmertemperatur eingedunstet. Der Trockenrückstand wurde in Wasser gelöst und in der vorbeschriebenen Art auf die Gegenwart eines die Totenstarre einleitenden Fermentes geprüft; auch hier wiederum ohne Erfolg.

Die negativen Ergebnisse der Autolyseversuche veranlafsten mich, es mit einem Mittel zu versuchen, das eine noch stärkere Lockerung der Gewebe herbeiführt als die Autodigestion, mit der Trypsinverdauung, doch mit gleich negativem Erfolg.

Totenstarre Pferdemuskeln wurden zerkleinert, in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert, die Flüssigkeit mit Natriumkarbonat schwach alkalisch gemacht und die Masse zwei Tage lang nach Trypsinzusatz bei Brutofentemperatur belassen. Sodann wurde filtriert, neutralisiert, der Eiweifsniederschlag abfiltriert und die Flüssigkeit schliefslich mit Uranylacetat unter Zusatz von Natriumkarbonat und Natriumphosphat gefällt. Der Niederschlag wurde auf einem Saugfilter gesammelt, mit Sodalösung von 0,2 Proz. verrieben und die nach eintägigem Stehen filtrierte Lösung auf einen Kochsalzgehalt von 2 Proz. gebracht. Die nunmehr vorgenommene physiologische Prüfung auf das in Rede stehende Ferment verlief auch hier resultatlos.

Da Fälle bekannt sind, wo ein Ferment nicht in freiem Zustande in einem Organe enthalten ist, vielmehr in Form eines Profermentes, das erst durch Säurewirkung aktiviert wird, schien es geboten, auch einen von diesem Gesichtspunkte aus angestellten Versuch nicht zu unterlassen.

Totenstarre Pferdemuskeln wurden daher mit verdünnter Essigsäure übergossen. Nach drei Tagen wurde die stark gequollene Masse mit Wasser verdünnt, filtriert, das Filtrat mit Natriumkarbonat neutralisiert und die vom Eiweifsniederschlag befreite klare Flüssigkeit auf einen Kochsalzgehalt von 2 Proz. gebracht. Auch hier fiel die Fermentprüfung negativ aus.

Schliefslich sei noch eines Versuchs gedacht, den ich anstellte, um mich zu vergewissern, ob nicht vielleicht ein im Muskel enthaltenes Proferment durch Kalkentziehung aktiviert werden könne. Zerkleinerte Pferdemuskeln wurden zu diesem Behufe mit 2 proz. Natriumfluoridlösung durchgeschüttelt. Das nach viertägigem Stehen gewonnene Filtrat wurde durch Dialyse vom Natriumfluorid befreit, auf einen Kochsalzgehalt von $1^1/_2$ Proz. gebracht und durch den Tierversuch geprüft, der auch hier die Unwirksamkeit der Lösung offenbarte.

Bei allen diesen Versuchen blieb die Frage unberührt, ob etwa bei der Autolyse des Muskels Substanzen nicht enzymatischer Natur auftreten, die befähigt wären, die Gerinnung des Muskelplasmas zu beschleunigen. Modica (l. c.) fand in der That, dafs sich unter den Muskelextraktivstoffen solche finden, die, in das Blutsystem von Fröschen eingebracht, Muskelstarre erzeugen. Es ist dies auch keineswegs überraschend; geht doch z. B. aus den Untersuchungen von Schmidt-Nielsen*) hervor, dafs Xanthinkörper zum mindesten bei der Autolyse des Fischfleisches in reichlichen Mengen aus höher zusammengesetzten organischen Substanzen abgespalten werden. Da sich nun aus den Versuchen O. Schmiedebergs**) ergiebt, dafs zahlreiche Purinderivate eine dem Koffein analoge starreerregende Wirkung auf das Muskelgewebe entfalten, die Koffeinstarre aber, meinen früher veröffentlichten Untersuchungen entsprechend, auf die Gerinnung der Muskeleiweifskörper zu beziehen ist, ist es sehr wahrscheinlich, dafs man etwa durch Anwendung entsprechend konzentrierter Muskelextrakte

*) Sigvald Schmidt-Nielsen, Zur Kenntnis der Autolyse des Fischfleisches. Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. 3, 266.

**) O. Schmiedeberg, Vergleichende Untersuchungen über die pharmakologischen Wirkungen einiger Purinderivate. Ber. d. deutschen chem. Ges. 34, 2550.

sowohl Muskelstarre als auch Gerinnung des Muskelplasmas in vitro hervorrufen könnte. Daſs aber derartige Beobachtungen nicht ohne weiteres zur Beurteilung der Erscheinungen der physiologischen Totenstarre verwendet werden dürfen, liegt wohl auf der Hand.

Aus den mitgeteilten Versuchen ergiebt sich sonach, daſs es mir nicht gelungen ist, Anhaltspunkte dafür zu gewinnen, daſs die Totenstarre durch ein Ferment ausgelöst wird. Es wäre jedoch sicherlich ganz unstatthaft, daraus den bestimmten Schluſs zu ziehen, daſs die Totenstarre in Wirklichkeit nicht durch einen enzymatischen Vorgang eingeleitet werde. In einer Frage wie der vorliegenden können nur positive, nicht aber negative Befunde als Beweise anerkannt werden, und es ist natürlich sehr wohl möglich, daſs es bei Benutzung anderer Methoden doch noch gelingen wird, ein „Totenstarreferment" aus Muskeln zu extrahieren.

2. Versuche betreffend gerinnungshemmende bezw. starrelösende Agentien.

1. Der negative Ausfall der Versuche, ein die Totenstarre auslösendes Ferment aus autolysierten Muskeln zu extrahieren, durfte nicht ohne weiteres als Beweis für das Fehlen eines die Gerinnung des Muskelplasmas einleitenden Enzyms angesehen werden. Denn solange nicht der exakte Beweis dafür erbracht ist, daſs die Totenstarre thatsächlich durch eine Gerinnung von Muskeleiweiſskörpern hervorgerufen wird, erfordert eine objektive Behandlung des Gegenstandes ein strenges Auseinanderhalten der beiden genannten Erscheinungen.

Als nun die Kochsalzextrakte aseptisch autolysierter Muskeln von dem erwähnten Gesichtspunkte aus untersucht wurden, ergab sich die überraschende Wahrnehmung, daſs dieselben nicht nur nicht fördernd, sondern in hohem Grade hemmend auf die Gerinnung der Muskeleiweiſskörper einwirken.

Die Hemmungswirkung macht sich nicht nur in Bezug auf die im Säugetiermuskelplasma ja nicht sonderlich augenfällige Spontangerinnung geltend. In viel schlagenderer Weise tritt sie dort zu Tage, wo die Gerinnung des Muskelplasmas durch Zusatz gewisser Agentien (wie z. B. Rhodannatrium oder salicylsaures Natron) in mächtiger Weise gefördert wird. Ein Beispiel möge das veranschaulichen.

In eine Reihe von Probiergläsern wurden je 5 ccm frisch bereitetes Hundemuskelplasma und überdies 5 ccm 10 proz. salicylsaures

Natron eingefüllt. Eine Hälfte der Proben wurde mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung versetzt, die andere mit dem gleichen Volumen eines mit Hülfe von physiologischer Kochsalzlösung gewonnenen Extraktes aus Kaninchenmuskeln, die fünf Tage lang im Brutofen der Autolyse überlassen worden waren. Die Proben der ersten Reihe begannen sich fast momentan zu trüben, und innerhalb einer Stunde bei Zimmertemperatur hatte sich ein mächtiger grobflockiger Niederschlag in der Flüssigkeit abgesetzt. Die anderen Proben dagegen, welche die Extraktionsflüssigkeit aus autolysierten Muskeln enthielten, waren noch nach 24 Stunden unverändert.

Nachdem zunächst sichergestellt worden war, dafs die Gerinnungshemmung nicht etwa auf eine Änderung der Reaktion zu beziehen sei, vielmehr auch der genau neutralisierten Autodigestionsflüssigkeit eigentümlich ist, ergab sich zunächst die Aufgabe, zu ermitteln, welcher Art von Agentien die gerinnungshemmende Substanz angehört.

Als wesentlichster Befund ergab sich ohne weiteres, dafs dieselbe kein Ferment ist, da sie durch Aufkochen in ihrer Wirkung nicht geschädigt wird.

Es wurde ferner eine Autolysenflüssigkeit durch Eindampfen und viermaliges Auskochen des sirupösen Rückstandes mit absolutem Alkohol in zwei Fraktionen zerlegt und durch den Vergleich derselben festgestellt, dafs die fragliche Substanz in kochendem Alkohol zwar nicht ganz unlöslich ist, dafs sich jedoch die Hauptmenge derselben in dem in Alkohol unlöslichen Rückstande findet.

Bei Fällung der Autolysenflüssigkeit mit Schwermetallen findet sich, wie nach Zersetzung der Niederschläge mit Schwefelwasserstoff ermittelt wurde, die gerinnungshemmende Substanz in den Fällungen. Doch ergab ein Fraktionierungsversuch mit Quecksilberacetat, dafs die Fällung keineswegs vollständig ist.

Da die wirksamen Lösungen stets eiweifsartige Substanzen enthielten (Albumosen bezw. Peptone), mufs es einstweilen dahingestellt bleiben, ob das gerinnungshemmende Agens mit einer derselben identisch ist oder nicht.

Hinsichtlich des Auftretens desselben ist zu bemerken, dafs es bereits bei kurzdauernder Autolyse beobachtet und auch nach sehr langer Dauer derselben nicht vermifst wird, dafs es ebenso bei der aseptischen wie bei der antiseptischen (Toluol-)Autolyse und endlich auch bei der mit Fäulnis einhergehenden Selbstverdauung vorkommt.

Einige weitere Versuche bezogen sich auf die Analyse der Hemmungswirkung in Bezug auf die einzelnen Eiweifskörper des Muskelplasmas, das Myosin und das Myogen, welche Substanzen mit Hülfe der fraktionierten Ammonsulfatfällung dargestellt worden waren. Die Gerinnung des Myogens erfolgt, wie ich bei früherer Gelegenheit nachweisen konnte, in zwei Phasen, insofern zunächst das bei 35—40° koagulierende lösliche Myogenfibrin und erst aus diesem das un-

lösliche Myogenfibrin entsteht. Es ergab sich, daß sich die Hemmungswirkung beiden Phasen gegenüber geltend macht, und daß sowohl der Übergang des Myogens in lösliches Myogenfibrin, als auch die Gerinnung dieses letzteren durch die Anwesenheit der hemmenden Substanz in hohem Maße verzögert wird.

Jedoch auch die Gerinnung des Myosins, welches viel leichter als das Myogen in eine unlösliche Modifikation übergeht, wird durch die Gegenwart des Hemmungsstoffes wenn auch nicht ganz aufgehoben, so doch wesentlich verzögert, und dies auch, wenn seine Tendenz zur Spontangerinnung durch die Gegenwart von Chinin hochgradig verstärkt erscheint.

2. Die Beobachtung einer gerinnungshemmenden Substanz in autolysierten Muskeln leitete zur Frage hinüber, ob man denn imstande sei, aus diesen letzteren ein Enzym zu isolieren, das geronnenes Muskeleiweiß wieder zu lösen vermag. Ich hatte bei meinen früheren Untersuchungen zeigen können, daß die von anderen Autoren vertretene Meinung, man könne geronnenes Eiweiß durch Salzlösungen wieder in Lösung bringen, auf einer Täuschung beruhte. Dagegen war es von vornherein sehr wahrscheinlich, daß, falls die Totenstarre wirklich auf einem Gerinnungsvorgang beruht, die Lösung derselben auf eine fermentative Spaltung der Eiweißgerinnsel in den Muskelschläuchen zu beziehen und mit den autolytischen Vorgängen in Zusammenhang zu bringen wäre. Bereits Brücke glaubte ein peptisches Ferment im Muskel gefunden zu haben.

Daß die autolytischen Vorgänge in totenstarren Muskeln außerordentlich intensive sind und schnell eine weitgehende Spaltung der nativen Muskeleiweißkörper in großem Umfange herbeiführen können, ist inzwischen durch eine wertvolle, im Laboratorium von F. Müller in Basel ausgeführte Untersuchung R. Vogels*) gezeigt worden.

Ich habe eine Anzahl von Versuchen, deren detaillierte Auseinandersetzung hier zu weitläufig wäre, ausgeführt, um ein eiweißverdauendes Ferment aus Muskeln in verschiedenen Stadien der Totenstarre und Autolyse zu isolieren, und hierbei auch die Vorsicht gebraucht, als Prüfungsobjekt nicht etwa nur Fibrin u. dgl., sondern auch spontan geronnenes Muskeleiweiß zu verwenden. Die Versuche fielen, soweit ich mit sterilen Flüssigkeiten arbeitete, durchaus negativ aus. Dort, wo ich Lösung der Eiweißgerinnsel im

*) R. Vogel, Untersuchungen über Muskelsaft. Deutsches Archiv für klinische Medizin 1902, S. 292—326.

Brutofen konstatieren konnte, ergab die bakteriologische Untersuchung auch die Gegenwart von Mikroorganismen.

Auch Vogels Bemühungen, ein eiweifsverdauendes Ferment aus Muskeln zu extrahieren, waren vergeblich.

Diesen negativen Befunden gegenüber steht ein positiver von Rosell*), der angiebt, er habe nach der Uranylacetat-Methode ein trypsinoides Ferment in den Muskeln gefunden.

Welches die Faktoren sind, welche die Extraktion des eiweifsspaltenden Fermentes aus Muskeln und den Nachweis desselben mit Hülfe der typischen Methoden so sehr erschweren, mag einstweilen dahingestellt bleiben. Denn dafs ein solches Enzym vorhanden ist, läfst sich angesichts der Art und Intensität der beobachteten autolytischen Vorgänge kaum bezweifeln.

Jedenfalls mahnen aber diese Wahrnehmungen auch zur Vorsicht in der Verwertung der negativen Befunde, soweit dieselben die Existenz eines „Totenstarrefermentes" betreffen.

3. Über die Bedeutung der Säure für das Auftreten und die Lösung der Totenstarre.

1. Aufser der Wirkung fermentativer Agentien ist insbesondere die postmortale Säurebildung im Muskel mit der Totenstarre und ihrer Lösung in Verbindung gebracht worden.

Nachdem bereits Kühne im Jahre 1859 beobachtet hatte, dafs Milchsäure einerseits eine Beförderung der Gerinnung des Muskelplasmas, andererseits aber eine Auflockerung der gebildeten Gerinnsel bewirke, hat sich insbesondere Catherine Schipiloff*) speziell mit dem Studium der Einwirkung von Säuren auf die Muskeleiweifskörper intra und extra corpus beschäftigt. Sie gelangte auf Grund ihrer Versuche zu der Annahme, die Totenstarre beruhe auf einer durch postmortale Säurebildung bewirkten Fällung der Muskeleiweifskörper, und die Lösung des Rigor mortis sei durch das spätere Auftreten noch gröfserer Säuremengen bedingt.

Diese Schlufsfolgerung erscheint bei näherer Betrachtung der Voraussetzungen, auf welchen sie beruht, keineswegs einwandsfrei. Denn wenn es auch keinem Zweifel unterliegt, dafs man Muskeleiweifskörper durch Anwendung entsprechend grofser Säuremengen

*) M. Rosell, Über Nachweis und Verbreitung intracellulärer Fermente. Inaug.-Dissert. Strafsburg 1901.

**) C. Schipiloff, Über die Entstehungsweise der Muskelstarre. Centralbl. f. d. med. Wiss. 1882, S. 291.

aus ihren Lösungen fällen und daß man diese Niederschläge in einem Überschusse von Säure wieder lösen könne, so wurde doch durch die Versuche C. Schipiloffs in keiner Weise der Beweis erbracht oder auch nur versucht, daß die hierzu erforderlichen Säurequantitäten zur Zeit, wo die Totenstarre auftritt, bezw. sich löst, thatsächlich im Muskel vorhanden sind.

Ich habe mir nun zum Zwecke der Klarstellung der Verhältnisse zunächst die Frage vorgelegt, ob und inwieweit die Spontangerinnung des Muskelplasmas durch die Anwesenheit von Säuremengen gefördert werde, die an sich unzureichend sind, um eine direkte Fällung der Eiweißkörper zu bewirken. Es möge mir gestattet sein, auf einen einschlägigen Versuch näher einzugehen.

Aus Hundemuskeln wurde mit Hülfe physiologischer Kochsalzlösung eine Extraktionsflüssigkeit bereitet und in einem Teile derselben die Acidität unter Anwendung von Phenolphthalein als Indikator titrimetrisch festgestellt. Es ergab sich, daß 100 ccm des Muskelplasmas zur Neutralisation 18,5 ccm $^1/_{10}$-n. NaOH erforderten. Es wurden nun Lösungen in drei Aciditätsgraden untersucht:

I. 100 ccm Muskelplasma + 18,5 ccm $^1/_{10}$-n. NaOH (dem Neutralisationspunkte entsprechend).
II. 100 „ „ ohne Zusatz.
III. 100 „ „ + 5 ccm $/_{10}$-n. H_2SO_4.

Bei einem Säurezusatz von 10 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 auf 100 ccm Muskelplasma erfolgte bereits direkte Eiweißfällung.

Proben zu je 5 ccm von I, II und III wurden nun mit 5 ccm von a) salicylsaurem Natron (10proz.), bezw. b) Rhodanammon (10proz.), bezw. c) physiologischer Kochsalzlösung versetzt und bei Zimmertemperatur beobachtet. Es ergab sich nun folgendes: Von den Proben der Serie c (physiologische Kochsalzlösung) waren die mit dem Aciditätsgrade I und II noch am nächsten Tage unverändert, während sich in den Proben III ein Niederschlag fand.

Von den Proben a (salicylsaures Natron) war I noch am nächsten Tage unverändert; II erschien nach einer Stunde schwach, III dagegen stark getrübt; am nächsten Tage enthielten sowohl II als auch III voluminöse Gerinnsel.

Von den Proben der Reihe b (Rhodanammon) enthielten bereits nach $^1/_4$ Stunde II einen feinflockigen und III einen mächtigen grobflockigen Niederschlag, während I unverändert geblieben war.

Aus diesem Versuche und anderen ähnlich angeordneten ergab sich, daß Säuremengen, die zu gering sind, um direkte Eiweißfällung zu bewirken, immerhin insofern einen merklichen Einfluß geltend machen, als sie die Gerinnung des Muskelplasmas wesentlich beschleunigen.

Da jedoch Muskelplasmen, deren Acidität so weit abgestumpft

ist, dafs selbst das besonders säureempfindliche Phenolphthalein keine Säure mehr erkennen läfst, nicht etwa dauernd ungeronnen bleiben, sondern eine (wenn auch sehr verlangsamte) Spontangerinnung erkennen lassen, so kann die Anwesenheit von Säure keineswegs eine unerläfsliche Bedingung für den Übergang der Muskeleiweifskörper in die geronnene Modifikation bilden.

Bereitet man mit Hülfe der fraktionierten Salzfällung und nachfolgender Dialyse eine neutrale Myogenlösung, so kann man beobachten, dafs dieselbe sehr lange Zeit (mitunter tagelang) klar bleibt; schliefslich kommt es aber doch zu einer Abscheidung von geronnenem Eiweifs, trotzdem dabei, wie titrimetrisch festgestellt werden konnte, von einer Säurebildung nichts zu bemerken ist.

2. Aus Serienversuchen, die derart angestellt wurden, dafs in einer Reihe von Reagiergläsern Eiweifslösung unter Einhaltung derselben Konzentration mit steigenden Säuremengen zusammengebracht wurde, ergab sich mit grofser Klarheit, dafs bereits sehr bald nach Überschreitung des Optimums (d. h. jener Acidität, bei der maximale Eiweifsfällung erfolgt) ein kleiner Säureüberschufs die vollständige Lösung des Niederschlages bewirkt.

Bei aufmerksamer Beobachtung zeigte sich nun aber ohne weiteres, dafs die Auffassung C. Schipiloffs, der zufolge die Lösung der Totenstarre auf eine Lösung gefällter Muskeleiweifskörper durch ein Plus von Säure im Muskel zu beziehen wäre, unmöglich den thatsächlichen Verhältnissen entsprechen könne.

Es ergab sich nämlich, dafs ein durch Säurezusatz in einem Muskelplasma erhaltener Eiweifsniederschlag nur im frisch gefällten Zustande in einem Überschusse der Säure leicht löslich ist, bereits nach kurzer Zeit aber alle Eigentümlichkeiten koagulierter Eiweifskörper annimmt; er löst sich dann selbst in heifsen konzentrierten Mineralsäuren nur sehr langsam, ist aber in schwächeren verdünnten Säuren (z. B. Essigsäure, Milchsäure u. dgl.) vollkommen unlöslich. Es handelt sich dabei um den bekannten und beim Studium der Muskeleiweifskörper immer wieder in Erscheinung tretenden Übergang gefällten Myogens und Myosins in Myogen- bezw. Myosinfibrin.

Es ist sonach ganz ausgeschlossen, dafs ein zur Zeit des Eintretens der Totenstarre etwa durch die Wirkung der Muskelsäure entstandener Eiweifsniederschlag sich noch nach einem oder mehreren Tagen in einem Überschusse dieser Säure lösen könnte. Falls es sich bei der Lösung der Totenstarre wirklich um Verflüssigung

eines Eiweifsniederschlages handelt, so kommt eine solche sicherlich nicht durch eine Säure, sondern jedenfalls durch Fermentwirkung zustande.

3. Es ergab sich nun weiterhin die für das vorliegende Problem wesentliche Frage, ob denn die Eiweifsfällung in einem Muskelplasma einsetzt, sobald die Säurekonzentration in demselben einen gewissen absoluten Prozentgehalt überschritten hat, oder ob die untere Fällungsgrenze in erster Linie durch die Eiweifskonzentration bedingt wird.

Es zeigte sich, dafs letzteres zutrifft. So ergab z. B., wie durch Serienversuche festgestellt wurde, ein Kochsalzextrakt aus Muskeln maximale Fällung bei einer Acidität von 14 ccm $^1/_{10}$-n. Säure auf 100 ccm Plasma. 100 ccm derselben aufs Doppelte verdünnten Extraktionsflüssigkeit wurden durch 6 bis 8 ccm $^1/_{10}$-n. Säure maximal gefällt, bei vierfacher Verdünnung aber bereits durch 2 bis 4 ccm $^1/_{10}$-n. Säure. Es bedarf wohl keiner Erwähnung, dafs man bei allen Versuchen dieser und ähnlicher Art niemals aufser acht lassen darf, dafs Wasser eine Myosinfällung in Muskelplasmen bewirkt. Man hat sich daher zur Verdünnung einer physiologischen Kochsalzlösung zu bedienen und mufs auch die Säure vor dem Zusatze auf einen entsprechenden Neutralsalzgehalt bringen.

Die löslichen Eiweifskörper des Muskels zeigen, wie man sieht, insofern einen basischen Charakter, als eine bestimmte Menge von Alkali abgestumpft werden mufs, bevor ihre Fällung durch eine Säure beginnt. Beachtenswerterweise gelingt es aber in keiner Weise, aus einem Muskelplasma alles Eiweifs durch noch so vorsichtigen Säurezusatz niederzuschlagen. Die Fällung bleibt unter allen Umständen eine sehr unvollständige.

4. Aus dem Mitgeteilten geht hervor, dafs die Frage, ob die Totenstarre auf eine direkte Eiweifsfällung durch die im Muskel nach dem Absterben entstandene Säure bezogen werden darf, ohne genaue Berücksichtigung der absoluten Säuremenge, die sich in der Gewichtseinheit des Muskels postmortal entwickelt, einerseits und der Eiweifskonzentration des nativen in den Muskelschläuchen enthaltenen Plasmas andererseits überhaupt nicht diskutiert werden könne.

Was zunächst den ersteren Faktor betrifft, kommt es dabei natürlich nur auf die Zunahme der Säure post mortem an, nicht aber auf die absolute Menge freier Säure, die im Muskel überhaupt enthalten ist. Ich konnte also von den weitläufigen Über-

legungen, durch welche Faktoren die Acidität der Muskeln bedingt wird, ob durch saure Salze oder durch freie Säuren, ganz absehen. Da es mir nicht um theoretisch richtige, sondern um sicher vergleichbare Werte zu thun war, schien mir die Verwendung des sehr säureempfindlichen Phenolphthaleins als Indikator für die Bestimmungen der Aciditätszunahme am zweckmäfsigsten zu sein.

In Bezug auf die über diesen Gegenstand bereits vorliegenden Erfahrungen sei hier namentlich auf die eingehenden Untersuchungen von Röhmann*) und von Heffter**) hingewiesen. Röhmann fand für 100 g frischer Hunde- bezw. Kaninchenmuskeln eine Acidität entsprechend 28,2 bis 48,7 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 (für Curcuma), bezw. 32,5 bis 41,0 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 (für Phenolphthalein); dagegen für 100 g totenstarrer Muskeln 32,8 bis 72,0 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 (für Curcuma), bezw. 42,0 bis 69,6 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 (für Phenolphthalein). Der beobachtete Unterschied zwischen frischen und starren Muskeln schwankte in den einzelnen Versuchen zwischen 2,0 und 31,8 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 für 100 g Muskeln.

Ich ging nun derart vor, dafs ich dem Tiere unmittelbar nach dem Tode Muskeln entnahm, dieselben fein zerhackte und nun von dem gut durchgemischten Muskelbrei sogleich eine Anzahl Portionen von 30 bis 50 g auf Dezigramme genau abwog. Ein Teil derselben wurde sogleich abgekocht, der Rest aber im Eisschranke kürzere oder längere Zeit aufbewahrt und erst dann untersucht.

Die Technik der einzelnen Aciditätsbestimmungen gestaltete sich sehr einfach. Die abgewogene Muskelmasse wurde einige Minuten lang mit Wasser gekocht, die Flüssigkeit sodann in einen gröfseren Kolben hineinfiltriert und der Vorgang viermal wiederholt. Die Extraktionsflüssigkeit wurde dann unter Anwendung von Phenolphthalein titriert. Bei einiger Übung lassen sich Verluste bei der Manipulation unschwer vermeiden. Die Vollständigkeit der Extraktion ist unter diesen Umständen eine für die Zwecke dieser Versuche durchaus ausreichende.

Ich führe die Ergebnisse dieser Bestimmungen tabellarisch an: Es ergab sich für die Extrakte aus je 100 g Muskeln folgende Acidität:

I. (Muskeln vom Hund)

			Differenz
frisch untersucht	24,0 ccm $^1/_{10}$-n. Säure		7,7 ccm $^1/_{10}$-n. Säure
nach 1 Tag untersucht .	30,7 33,8	Mittel 31,7 ccm $^1/_{10}$-n. Säure	
„ 2 Tagen untersucht	36,8		5,1 „ „ „

*) F. Röhmann, Über die Reaktion der quergestreiften Muskeln. Pflügers Arch. 50, 88 (1891). — Kritisches und Experimentelles zur Frage nach der Säurebildung im Muskel bei der Totenstarre. Ebenda 55, 589 (1894).

**) A. Heffter, Beiträge zur Chemie des quergestreiften Muskels. Arch. f. exp. Path. 31, 225 (1893).

II. (Muskeln vom Hund)

	Einzelwerte	Mittel	Differenz
frisch	31,0 ccm $^{1}/_{10}$-n. Säure		9,1 ccm $^{1}/_{10}$-n. Säure
nach 3 Tagen	41,3 38,9	Mittel 40,1 ccm $^{1}/_{10}$-n. Säure	

III. (Muskeln vom Hund)

	Einzelwerte	Mittel	Differenz
frisch	26,9 27,6	Mittel 27,3 ccm $^{1}/_{10}$-n. Säure	8,8 „ „ „
nach 1 Tag	36,2 35,9	„ 36,1 „ „ „	

IV. (Muskeln vom Kaninchen)

	Einzelwerte	Mittel	Differenz
frisch	30,7 32,3	Mittel 31,5 ccm $^{1}/_{10}$-n. Säure	6,7 „ „ „
nach 1 Tag	37,7 38,7	„ 38,2 „ „ „	

V. (Muskeln vom Kaninchen)

	Einzelwerte	Mittel	Differenz
frisch	37,3 ccm $^{1}/_{10}$-n. Säure		7,6 „ „ „
nach 1 Tag	44,9 „ „ „		

5. Da die mitgeteilten Versuche ergeben hatten, dafs die postmortale Aciditätszunahme im Säugetiermuskel nur innerhalb ziemlich enger Grenzen schwankt, konnte nunmehr die Frage untersucht werden, ob die beobachtete Säurebildung ausreicht, um in dem die Muskelschläuche erfüllenden Muskelplasma eine Eiweifsfällung zu bewirken. Es liefs sich das in einfacher Weise konstatieren, indem man die Muskeln eines frisch getöteten Tieres möglichst rasch ohne jeden Reagentienzusatz unter starkem Drucke auspresste und das so gewonnene unverdünnte Muskelplasma sogleich mit jener Säuremenge versetzte, die erfahrungsgemäfs zur Wirkung gelangt wäre, wenn man den Muskel in intaktem Zustande den normalen postmortalen Veränderungen überlassen hätte. Es mufste sich so herausstellen, ob eine direkte Beeinflussung der Muskeleiweifskörper erfolgt oder nicht.

Durch Serienversuche, bei denen eine Reihe von Eprouvetten mit der gleichen Menge des Muskelplasmas und mit kontinuierlich steigenden Säurequantitäten beschickt wurde, konnte genau festgestellt werden, bei welcher Acidität das betreffende Plasma thatsächlich gefällt wird.

Dergleichen Versuche bedürfen natürlich sorgfältiger Vorbereitungen, um die zahlreichen notwendigen Manipulationen entsprechend schnell durchführen zu können. Es gelang mir, dieselben derart einzurichten, dafs ich innerhalb einer Stunde nach dem Tode der Tiere die Serienversuche an dem mit Hülfe der Buchnerschen Presse gewonnenen Prefssafte ausführen konnte.

Ein so gewonnener frischer Prefssaft aus Kaninchenmuskeln wurde bereits bei Zusatz einer Säuremenge von 2,7 bis 3,3 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 auf 100 ccm Plasma direkt gefällt; ein Plasma von Hundemuskeln dagegen bei einer Acidität entsprechend 5,7 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 auf 100 ccm Flüssigkeit.

Vergleicht man diese Werte mit denjenigen, welche für die postmortale Zunahme der Acidität ermittelt worden sind (6,7 bis 12,8 ccm pro 100 g Muskel), so ergiebt sich der Schlufs, dafs die gesamte nach dem Tode im Muskel auftretende Säuremenge thatsächlich ausreichen dürfte, um eine Eiweifsfällung im Muskelplasma zu bewirken*).

6. Es wäre nun aber sehr voreilig, aus dieser Beobachtung ohne weiteres den Schlufs zu ziehen, eine durch die postmortal auftretende Muskelsäure hervorgerufene Eiweifsfällung sei als Ursache der Totenstarre anzusehen. Ein solcher Schlufs wäre (ganz abgesehen davon, dafs der strenge Beweis dafür, dafs die Totenstarre überhaupt durch eine Eiweifsfällung oder -gerinnung hervorgerufen wird, noch aussteht) nur dann einigermafsen berechtigt, wenn man zeigen könnte, dafs die zur Fällung der Plasmaeiweifskörper erforderliche Säuremenge im Muskel bereits zu jener Zeit angehäuft ist, wo die Totenstarre beginnt.

Ich führte nun zur Klarstellung des Sachverhaltes folgenden Versuch aus: Aus den Extremitätenmuskeln der einen Körperhälfte eines frisch getöteten Hundes wurde, wie oben, möglichst schnell Prefssaft hergestellt, wobei ich die Muskulatur der oberen und der unteren Extremität getrennt verarbeitete. In abgewogenen Proben des frischen Muskels wurde aufserdem die Acidität bestimmt. Serienversuche ergaben, dafs diese beiden Prefssäfte (ohne Reagentienzusatz gewonnen) bei einer Aciditätszunahme von 13,2 bis 14,7 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 direkt gefällt wurden. An den intakten Extremitäten der anderen Seite wurde

---

*) Eine Berechnung, wie die oben angeführte, kann natürlich nur Näherungswerte ergeben. Es ist dabei zu beachten, dafs der Buchnerprefssaft ein nicht ganz unverdünntes Muskelplasma repräsentiert. Dem Inhalte der Muskelschläuche wird dabei etwas Blut und Gewebslymphe beigemengt. Andererseits ist aber zu bedenken, dafs 100 g Muskelgewebe keineswegs gleichbedeutend sind mit 100 ccm Muskelplasma. Denn selbst angenommen, das Muskelplasma hätte ein gleiches spezifisches Gewicht wie das feste Gewebe, so okkupiert es doch nur eben jenen Platz, der durch das Stroma übriggelassen wird. Wollten wir uns vorstellen, dafs die postmortal entstandene Säure in ihrer Gesamtheit nur auf das Plasma verteilt ist, so müssen wir für ihre prozentische Konzentration in demselben einen noch höheren Wert berechnen, als wir es oben gethan haben.

der Eintritt der Totenstarre beobachtet, die in diesem Falle in oberen und unteren Extremitäten nahezu gleichzeitig, nach drei Stunden, voll entwickelt war. Nunmehr wurde wieder in entnommenen Muskelproben die Acidität festgestellt. Der Versuch ergab:

Untere Extremität:

Acidität von 100 g frischer Muskeln:
34,3 ccm $^1/_{10}$-n. Säure (Indikator: Phenolphthalein)
" " " " totenstarrer Muskeln, 3 Stunden post mortem:
36,3 ccm $^1/_{10}$-n. Säure
Aciditätszunahme für 100 g Muskeln:
3,0 ccm $^1/_{10}$-n. Säure.

Obere Extremität:

Acidität von 100 g frischer Muskeln:
33,3 ccm $^1/_{10}$-n. Säure
" " " " totenstarrer Muskeln, 3 Stunden post mortem:
33,3 ccm $^1/_{10}$-n. Säure
Aciditätszunahme für 100 g Muskeln 0.

Dieser Versuch lehrt in klarer und eindeutiger Weise, dafs zu jener Zeit, wo die Totenstarre bereits voll entwickelt war, höchstens ein Bruchteil jener Säuremenge, die zu einer direkten Fällung der Muskeleiweifskörper erforderlich wäre (in diesem Falle 13,2 bis 14,7 ccm), wirklich vorhanden war. Es erscheint also ausgeschlossen, dafs die Totenstarre durch eine Säurefällung von Muskeleiweifskörpern bedingt wird.

Dagegen scheint aus den oben mitgeteilten Versuchen hervorzugehen, dafs, wenn die postmortale Säurebildung im Laufe eines oder mehrerer Tage in dem Muskel fortschreitet, es doch noch nachträglich in dem schon totenstarr gewordenen Organ zu einer direkten Säurefällung von ungeronnen gebliebenen Plasmaeiweifskörpern kommen kann.

7. Wenn man also das ursächliche Agens für die Auslösung der Totenstarre keineswegs mit der postmortalen Säurebildung identifizieren darf, so würde man doch wohl zu weit gehen, wenn man jede Beeinflussung der Totenstarre durch den Aciditätsgrad des Muskels in Abrede stellen wollte. Bekanntlich unterliegt die Totenstarre hinsichtlich der Schnelligkeit ihres Auftretens und ihrer Intensität grofsen individuellen Schwankungen. Alle Beobachter stimmen aber darin überein, dafs hochgradige Muskelanstrengungen, Krämpfe u. dgl. unmittelbar vor dem Tode die Totenstarre aufserordentlich befördern. Nun steht es aber bekanntlich fest, dafs dieselben physiologischen Faktoren auch die Acidität der Muskeln steigern. Es liegt daher nahe, anzu-

nehmen, dafs z. B. die Muskeln eines mit Strychnin vergifteten Tieres deswegen so schnell starr werden, weil sie viel mehr Säure enthalten und diese einen fördernden Einflufs auf den durch ein anderes physiologisches Moment (vielleicht ein fermentatives Agens) ausgelösten Gerinnungsvorgang im Muskelplasma geltend macht.

Auch für die Erscheinungen der toxischen „Arbeitsstarre", wie sie Pohl bei der Vergiftung durch monobromessigsaures Natron und Santesson bei der Chininvergiftung beobachtet hat, und die dadurch charakterisiert erscheint, dafs der Muskel nur nach einer vorhergegangenen Arbeitsleistung in den Zustand der Muskelstarre übergeht, dürfte sich aus den mitgeteilten Beobachtungen eine ungezwungene Erklärung ergeben. Wie ich bei früherer Gelegenheit ermittelt habe, befördern die genannten Substanzen, wie überhaupt alle jene chemischen Agentien, welche geeignet sind, eine künstliche Muskelstarre am lebenden Tiere zu erzeugen, nachweisbar die Gerinnung der Muskeleiweifskörper in vitro. Man gelangt so zu der Vorstellung, dafs die Wirkung der erstgenannten Gifte im Tierkörper nur dann zu einer wirklichen Koagulation der Muskeleiweifskörper führt, wenn der gerinnungsbefördernde Einflufs derselben durch eine (im Anschlufs an die Muskelarbeit erfolgende) Erhöhung des Säuregehaltes im Muskel kräftig gesteigert wird.

8. Im Anschlusse an die mitgeteilten Beobachtungen habe ich auch einige Versuche betreffend die Säurestarre an lebenden Tieren ausgeführt.

Setzt man einer bestimmten Menge Muskelplasma allmählich immer mehr und mehr Säure zu, so gelangt man, wie erwähnt, schliefslich zu einem Punkte, wo die Eiweifskörper auszufallen beginnen. Diese Fällungsgrenze ist, wie wir gesehen haben, in erster Linie durch die Eiweifskonzentration des Muskelplasmas bedingt, und man kann dieselbe natürlich ebenso gut durch Zusatz einer relativ geringeren Menge einer konzentrierteren, wie durch eine entsprechend gröfsere Menge einer verdünnteren Säure erreichen.

Es war nun von Interesse, festzustellen, wie sich das in den Muskelschläuchen eines lebenden Tieres enthaltene Muskelplasma in dieser Hinsicht verhält. Mufs man, um zur Fällungsgrenze, d. h. zum Eintritte der Säurestarre zu gelangen, eine bestimmte absolute Säuremenge, gleichgültig in welcher Verdünnung, zuführen? Oder ist gerade die Konzentration der Säure das Mafsgebende, derart, dafs man bis zu einer gewissen Konzentra-

tionsgrenze beliebige Säuremengen durch die Muskelgefäfse passieren lassen kann, ohne die Starre auszulösen, während jede weitere Steigerung der Konzentration sofort zur Gerinnung der Eiweifskörper in den Muskelschläuchen führt?

Ich konnte mich überzeugen, dafs letzteres der Fall ist. Ich liefs langsam einen Strom säurehaltiger physiologischer Kochsalzlösung in die Arteria femoralis eines durch Verblutung frisch getöteten Hundes einfliefsen und durch die Vena femoralis wieder ausströmen und steigerte dabei stufenweise von 50 zu 50 ccm die Säurekonzentration. Bei einer Acidität von 30 ccm $^1/_{10}$-n. H_2SO_4 auf 100 ccm Flüssigkeit war noch kein Einflufs zu bemerken; bei einer weiteren Steigerung der Acidität (35 ccm $^1/_{10}$-n. Säure : 100) entwickelte sich alsbald die Säurestarre.

Es steht dieser Befund mit den oben mitgeteilten Bestimmungen der Acidität des frischen Hundemuskels (24—31 ccm $^1/_{10}$-n. Säure pro 100 g Muskel) im Einklang. Es erfolgt eben ein osmotischer Austausch zwischen der Transfusionsflüssigkeit und dem Inhalte der Muskelschläuche, und erst wenn die Säurekonzentration aufserhalb der Sarkolemmschläuche gröfser ist als innerhalb, wird die Säure in das Muskelplasma hineindiffundieren und dasselbe fällen können.

Ein ähnlicher Versuch am Frosche, wobei die Transfusionsflüssigkeit durch den Arterienbogen einflofs, ergab eine Acidität von 25 ccm $^1/_{10}$-n. Säure pro 100 ccm Flüssigkeit als Grenzwert der Fällung.

9. Schliefslich sei hier noch einer Reihe von Beobachtungen gedacht, die sich auf die Natur der postmortal im Muskel auftretenden Säure beziehen. Bekanntlich weisen die Litteraturangaben über diesen Gegenstand erhebliche Widersprüche auf. Die verbreitete Meinung, es handle sich um Milchsäure, ist durchaus nicht von allen Autoren angenommen worden.

Weyl und Zeitler*) fanden bei ihren Versuchen, dafs die Menge anorganischer Phosphorsäure im Muskel beim Tetanus merklich zunimmt, während gleichzeitig die organisch gebundene, in lecithinartigen Substanzen enthaltene Phosphorsäure eine entsprechende Abnahme erfährt.

Es lag daher nahe, an die Möglichkeit zu denken, dafs auch

*) Weyl und Zeitler, Über die saure Reaktion des thätigen Muskels und über die Rolle der Phosphorsäure beim Muskeltetanus. Zeitschrift für physiol. Chemie 6, 557.

die postmortale Aciditätszunahme wenigstens zum Teile auf Rechnung von Phosphorsäure zu setzen wäre, die durch Spaltungsvorgänge nicht nur aus lecithinartigen Substanzen, sondern auch aus Verbindungen von der Art der Inosinsäure und Phosphorfleischsäure entstehen könnte.

Ich habe daher bei einer Anzahl von Tieren den Gehalt an anorganischer Phosphorsäure in frischen und totenstarren Muskeln verglichen. Die Bestimmungen wurden auf titrimetrischem Wege ausgeführt, da diese Methode einen schnellen und für die Zwecke dieser Untersuchung ausreichenden Überblick gestattet.

Die Technik der Untersuchung gestaltete sich derart, dafs je 30 g der feingehackten Muskeln teils frisch, teils totenstarr abgewogen und mit viermal erneuerten Portionen Wasser ausgekocht wurden. Die Extraktionsflüssigkeit wurde in einem Mefskolben von 1/2 Liter Gehalt filtriert und bis zur Marke aufgefüllt. Dann wurden von der gut umgeschüttelten Flüssigkeit Portionen von je 150 ccm im Mefskolben abgemessen. Der Inhalt eines solchen wurde in einen gröfseren Kolben quantitativ übergespült, mit genau 5 Tropfen einer Cochenilletinktur und mit 10 ccm einer Natriumacetatlösung versetzt (100 g Natriumacetat und 30 ccm Eisessig im Liter enthaltend). Sodann wurde aufgekocht, eine Uranylacetatlösung von bekanntem Gehalte (1 ccm = 0,001 gr P_2O_5) portionenweise zugesetzt, immer wieder aufgekocht und (event. nach Filtration einer kleinen Probe) beobachtet, wann die rötliche Färbung der überstehenden Flüssigkeit eben geschwunden war. Das Verschwinden der Rotfärbung wurde als Endreaktion angesehen*).

Es fanden sich in je 100 g Muskeln:

I. Kaninchen:

frisch	nach 2 Tagen	frisch nach Kochen mit verdünnter Salzsäure
0,311 } g P_2O_5	0,338 } g P_2O_5	0,383 } g P_2O_5
0,311	0,350	0,372
0,322 } " "	0,344 } " "	0,361 } " "
0,323	0,338	0,361
	0,350 " "	
	0,355 " "	

II. Kaninchen:

nach 2 Tagen 0,338 } g P_2O_5
0,350

*) Die Anwendung des bei der Harnanalyse üblichen Verfahrens, wobei das Auftreten einer grünen, beim Kochen nicht verschwindenden Färbung des Niederschlages als Endpunkt angesehen wird, erwies sich in diesem Falle nicht als brauchbar, da auf diese Weise keine ausreichend scharfe Endreaktion erzielt werden konnte. Da es sich hier nicht um absolute Werte, sondern um Vergleichswerte handelt, erscheint die erwähnte Modifikation statthaft.

III. Kaninchen (durch Curare getötet):

frisch	nach 1 Tag	mit Salzsäure gekocht
0,322 } g P_2O_5	0,322 } g P_2O_5	0,377 g P_2O_5
0,317 }	0,328 }	0,366 „ „
0,300 } „ „	0,333 } „ „	
0,311 }	0,341 }	
0,322 } „ „	0,328 } „ „	
0,333 }	0,322 }	

IV. Kaninchen (nach $3^1/_2$ stündiger Curarelähmung bei künstlicher Respiration getötet):

frisch	nach 3 Tagen
0,337 g P_2O_5	0,372 g P_2O_5
0,357 „ „	0,405 } „ „
	0,417 }

V. Kaninchen:

frisch	nach 1 Tag
0,309 } g P_2O_5	0,329 } g P_2O_5
0,309 }	0,331 }
0,322 } „ „	0,325 „ „
0,335 }	

Aus diesen Beobachtungen läfst sich so viel entnehmen, dafs von der im Muskel angehäuften organisch gebundenen Phosphorsäure, während die postmortale Autolyse des Muskelgewebes fortschreitet, ein Teil allmählich in anorganische Phosphorsäure übergeführt wird. Es steht dieser Befund durchaus im Einklange mit älteren Beobachtungen Salkowskis*), der bei der Autodigestion von Organen und speziell auch von Muskeln Spaltung von phosphorhaltigen Substanzen zu beobachten vermochte. Dagegen widerspricht er (soweit ich einem mir vorliegenden Referat entnehmen kann) den Beobachtungen Magnanimis**), der zur Zeit der Lösung der Totenstarre eine Abnahme des Phosphorsäuregehalts von Muskelextrakten gefunden zu haben scheint.

Was nun aber die uns hier in erster Linie interessierende Frage betrifft, ob die zur Zeit des Einsetzens der Totenstarre beobachtete Aciditätszunahme auf das Freiwerden von anorganischer Phosphorsäure bezogen werden könne, so glauben wir, dieselbe verneinend beantworten zu müssen. Denn selbst nach 24 bis 48 Stunden ist eine zweifellose, aufser-

*) E. Salkowski, Über die Autodigestion der Organe. Zeitschr. f. klin. Med. 17, Suppl.-Bd., 77—100.

**) Magnanimi, Chemische Veränderungen in den Muskeln bei der Totenstarre. Soc. lancisiana Roma, Febr. 1901. (Cit. nach Jahresber. f. Tierchemie 31, 553.)

halb der Fehlergrenzen fallende Phosphorsäurezunahme nicht zu konstatieren [frische Muskeln 0,311—0,357 g P_2O_5 in 100 g Muskeln*); Muskeln 1—2 Tage post mortem 0,322—0,355 g P_2O_5].

Die Befunde finden eine willkommene Ergänzung in den kürzlich veröffentlichten Versuchen W. A. Osbornes**), welche die Beziehungen der Milchsäurebildung zum Rigor mortis zum Gegenstande haben. Unter Anwendung eines neuen Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der Milchsäure vermochte Osborne zu konstatieren, dafs die postmortale Bildung von Milchsäure im Säugetiermuskel thatsächlich sofort nach Aufhören der Zirkulation einsetzt und dafs dieselbe durch Reizung des Muskels gesteigert wird. Man hat daher nunmehr keinen triftigen Grund, daran zu zweifeln, dafs es sich bei der postmortalen Säurebildung im Muskel in Wirklichkeit um Milchsäure handelt, wie dies ja die älteren Physiologen auch meist angenommen haben.

4. Bedeutung des Kalkes für das Auftreten der Muskelstarre.

1. Neben der postmortalen Säurebildung war es noch ein anderer Faktor chemischer Art, der von älteren Autoren mehrfach mit den Gerinnungsvorgängen im Muskelplasma in Zusammenhang gebracht wurde, nämlich der Kalkgehalt desselben. Nachdem man die Beziehungen der im Blute enthaltenen Kalkverbindungen zu den Vorgängen der Fibringerinnung erkannt hatte, lag es nahe, ähnliche Verhältnisse bei der Gerinnung des Muskelsaftes zu vermuten, und so hat namentlich Danilewsky***) auf den Kalkgehalt des Muskeleiweifsgerinnsels nachdrücklich hingewiesen.

Später behauptete Cavazzani†), dafs das Kaliumoxalat, ähnlich wie es die Blutgerinnung infolge Kalkbindung zu hindern vermag, auch der Gerinnung des Muskelplasmas und infolgedessen dem Auftreten der Totenstarre entgegenwirke. Doch vermochten Howell und Locke††) seine Angaben nicht zu bestätigen.

Da ich bereits gelegentlich einer früheren Untersuchung mich

---

*) Weyl und Zeitler (loc. cit.) fanden 0,288—0,341 g P_2O_5 in 100 g frischer ruhender Muskeln.

**) W. A. Osborne, Journ. of Physiol. 26, IL—L, 1901.

***) A. Danilewsky, Myosin, seine Darstellung u. s. w. Zeitschr. f. physiol. Chem. 6, 158 ff.

†) Cavazzani, Del azione dell' ossalato potassico sul plasma musculare. Riform. Med. 1892, S. 131—132 (cit. n. Jahresber. f. Tierchemie 1892, S. 333).

††) F. S. Locke, Note on Oxalates and Muscle-Rigor. Journ. of Physiol. 17, 293—295, 1894—1895.

überzeugt hatte, daſs Calciumsalzlösungen in gröſseren Konzentrationen einen fördernden Einfluſs auf die Gerinnung einer Myogenlösung ausüben, waren Versuche zur Klärung der Frage, ob die Anwesenheit von Kalksalzen im Muskelplasma zu der Gerinnung desselben in Beziehung stehe, am Platze.

Ich extrahierte Pferdemuskeln mit verdünnter Natriumfluoridlösung, um ein nach Möglichkeit von Calcium befreites Muskelplasma zu gewinnen, und stellte daraus durch Dialyse und Erhitzen auf 56° eine von Salzen und anderen Eiweiſskörpern befreite Myogenlösung her. Zu je 5 ccm derselben wurden hinzugefügt: a) 5 ccm physiologische Kochsalzlösung; b) 5 ccm 10 proz. salicylsaures Natron; c) 5 ccm 10 proz. salicylsaures Natron und 0,5 cm 10 proz. Calciumchlorid; d) 5 ccm 10 proz. Rhodannatrium und e) 5 ccm 10 proz. Rhodannatrium und 0,5 ccm 10 proz. Calciumchlorid. Nach einigen Stunden war nicht nur a, sondern auch b und d unverändert, während die kalkhaltigen Proben c und e massenhafte Gerinnsel gebildet hatten. Weitere Versuche ergaben, daſs dieses Ergebnis nicht etwa auf eine saure Reaktion der Kalksalzlösung zu beziehen ist (denn auch eine ammoniakalische Lösung hat die gleiche Wirkung) und daſs auch eine sehr geringe Menge Calciumchlorid (0,1 Proz.) genügt, um die Erscheinung in voller Deutlichkeit hervorzurufen.

Es unterliegt daher keinem Zweifel, daſs die Gerinnbarkeit des Muskelplasmas durch Zusatz geringer Mengen von Kalksalzen wesentlich erhöht wird. Daſs aber die Anwesenheit anorganischer Kalkverbindungen keine notwendige Bedingung für die Spontangerinnung der Muskeleiweiſskörper bildet, ergiebt sich aus der Beobachtung, daſs eine künstlich von Kalk befreite Myogenlösung zwar sehr spät, aber schlieſslich doch noch spontan koaguliert.

Wir werden daher schwerlich fehlgehen, wenn wir einen gröſseren oder geringeren Gehalt des Muskelplasmas an Kalksalzen, ebenso wie eine gröſsere oder geringere Acidität desselben jenen physiologischen Bedingungen zurechnen, welche den zeitlichen Ablauf der Spontangerinnung mit beeinflussen.

2. Falls nun die Erscheinungen der Gerinnung des Muskelplasmas in vitro und des Einsetzens der Totenstarre wirklich einander parallel gehen, muſste man erwarten, daſs die Bindung der im Muskel enthaltenen Kalksalze durch kalkfällende Mittel, Cavazzanis erwähnten Beobachtungen entsprechend, eine Verzögerung des Eintritts der Totenstarre zur Folge habe.

Ich war daher nicht wenig überrascht, zu sehen, daſs sich bei Injektion einer 5 proz. Natriumfluoridlösung in die Schenkelarterie eines frisch getöteten Kaninchens die erwartete Verzöge-

rung der Totenstarre nicht nur nicht bemerkbar machte, dafs sich vielmehr fast augenblicklich und regelmäfsig eine hochgradige Muskelstarre einstellte. Binnen $^1/_4$ Stunde waren sämtliche Gelenke der betreffenden Extremität maximal gestreckt und fixiert und alle Muskeln hart und voluminös, während die mit dem gleichen Volumen 5 proz. Natriumchloridlösung injizierte Kontrollextremität noch nach einer Stunde und später weich und beweglich erschien.

Analoge Versuche an Fröschen ergaben schwankende Resultate.

Ich mufste nun erwarten, dafs das Natriumfluorid jenen Agentien zuzuzählen sei, welche die Gerinnung des Muskelplasmas fördern.

Denn ich hatte gelegentlich meiner früheren Untersuchungen beobachten können, dafs alle jene Agentien, welche Muskelstarre erzeugen, auch die Gerinnung des Muskelplasmas beschleunigen und verstärken. Und als ich jüngsthin das Natriumperchlorat, das nach Hans Meyer den Muskelstarre erzeugenden Giften zuzurechnen ist, in dieser Richtung prüfte, konnte ich ebenfalls eine gerinnungsbefördernde Wirkung wahrnehmen.

Es war mir daher doppelt überraschend, zu beobachten, dafs das Natriumfluorid die Gerinnung des Muskelplasmas keineswegs fördert, sondern eher hemmt. Ein mit dem gleichen Volumen 5 proz. Natriumfluoridlösung versetztes Muskelplasma war nach drei Tagen bei Zimmertemperatur noch völlig klar geblieben, während sich die mit 5 proz. Natriumchloridlösung versetzte Kontrollprobe schon nach einem Tage infolge Abscheidung von geronnenem Eiweifs getrübt hatte.

Die Natriumfluoridstarre läfst sich daher nicht in dem gewöhnlichen Schema unterbringen. Es handelt sich dabei vielmehr um eine Erscheinung besonderer Art, deren genaueres Studium ich weiteren Untersuchungen vorbehalten möchte.

3. Dafs aber das genauere Studium der Erscheinungen der chemischen Muskelstarre nicht nur ein toxikologisches, sondern auch ein rein physiologisches Interesse bieten dürfte, scheint mir aus einigen neuen Beobachtungen hervorzugehen. Es war mir bei meinen älteren Versuchen über die Einwirkung von Giften auf die Eiweifskörper des Muskelplasmas aufgefallen, dafs zwar, wie erwähnt, alle Starre erregenden Gifte die Gerinnung des Muskelplasmas in vitro fördern, dafs aber nicht das Umgekehrte gilt. Gerade jene Substanzen, welche extra corpus die Spontangerinnung des Muskelplasmas in mächtigster Weise beschleunigten, wie das

Rhodannatrium und das salicylsaure Natron, versagten, in die Muskelgefäfse eines lebenden Tieres gespritzt, gänzlich und erwiesen sich als untauglich, Muskelstarre zu erzeugen.

Ich habe nunmehr beobachtet, dafs es unter Umständen gelingt, fast momentan Muskelstarre höchsten Grades zu erzeugen, wenn man eine Lösung dieser Salze in die Muskelgefäfse eines frisch getöteten Säugetieres einströmen läfst, noch sicherer aber, wenn man der Injektionsflüssigkeit eine geringe Menge eines Calciumsalzes hinzufügt.

Weit weniger schlagend waren die Versuche an Fröschen. Doch sah ich auch hier in einem Falle nach Injektion von salicylsaurem Natron ausgesprochene Muskelstarre eintreten, nachdem ich durch eine vorhergehende Injektion von arsenigsaurem Natron die Muskeln zum Absterben gebracht hatte.

Aus diesen Versuchen, die natürlich nach vielen Richtungen hin einer Ausgestaltung bedürfen, scheint mir einstweilen so viel hervorzugehen, dafs wir in den genannten Substanzen Reagentien besitzen, die mit grofser Schärfe einen bestimmten physiologischen Zustand des Muskels zu erkennen gestatten. Über die Natur der zugehörigen Zustandsänderung hoffe ich bei späterer Gelegenheit berichten zu können.

Zum Schlusse noch einige Worte über das Bild, welches die Spontangerinnung des Muskelplasmas darbietet, da darüber, wie es scheint, vielfach irrige Meinungen verbreitet sind.

Erscheinungen, die einigermafsen an die Gerinnung des Blutes erinnern, nämlich ein gallertiges Erstarren der ganzen Flüssigkeit, beobachtete ich ausschliefslich am Muskelplasma von Kaltblütlern; so in konzentrierten Muskelprefssäften von Fröschen, Fischen, Salamandern, Axolotеln u. dgl. Am Muskelplasma von Säugetieren hatte ich nie Gelegenheit, dergleichen zu sehen, trotzdem ich mit Hülfe der Buchnerschen Presse wiederholt äufserst konzentrierte Prefssäfte bereitet habe. Auch in diesen Fällen ist das Bild der „Spontangerinnung“ ein recht unscheinbares und beschränkt sich auf die Bildung eines spärlichen, erst fein-, dann grobflockigen, sich nach einigen Stunden absetzenden Niederschlages, der, wie ich bei früherer Gelegenheit wiederholt hervorgehoben habe und wiederum betonen möchte, nur einen sehr geringen Bruchteil der gelösten Muskeleiweifskörper ausmacht.

Falls dieser spärliche und unansehnliche Niederschlag wirklich

das materielle Substrat der Totenstarre ist, sollte man eigentlich erwarten, daſs seine Entstehung mit dem Einsetzen der Totenstarre zusammenfalle. In einem Versuche, wo ich darauf geachtet habe, war dies nicht der Fall. Ich bereitete mit Hülfe der Buchnerschen Presse schnell und ohne jeden Reagentienzusatz einen Preſssaft aus den Extremitätenmuskeln der einen Körperhälfte eines frisch getöteten Hundes und beobachtete an den in situ belassenen Muskeln der anderen Seite das Eintreten der Totenstarre. Dabei ergab sich, daſs die Niederschlagsbildung in vitro einige Stunden später erfolgte als das Einsetzen des Rigor mortis.

XXXII.

Über die Autolyse der Lymphdrüsen.

Von cand. med. **Alfred Reh.**

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strafsburg.)

Die regressive Metamorphose leukocytenreicher pathologischer Produkte und die nachträgliche Resorption derselben ist ein so verbreitetes Vorkommnis, dafs Untersuchung analoger Vorgänge an leukocytenreichen Organen Interesse beanspruchen darf. Das in dieser Beziehung nächstliegende Material, die Lymphdrüsen, ist bisher noch nicht bearbeitet. Ich habe mich daher auf Anregung des Herrn Prof. Hofmeister dieser Aufgabe unterzogen.

20 kg Rindslymphdrüsen wurden von Fett befreit, fein zerhackt, mit der gleichen Menge Wasser versetzt und unter Toluol einer vierwöchentlichen Autolyse bei 30 bis 40° überlassen. Nach dieser Zeit wurde die erst abkolierte, dann filtrierte Flüssigkeit durch Kochen unter Essigsäurezusatz von Eiweifs befreit.

Das Filtrat wies keine Biuretreaktion mehr auf, wohl aber gab es die Millonsche Reaktion und mit Ferrocyankalium-Essigsäure noch eine Trübung; es wurde durch Phosphorwolframsäure gefällt, löste Kupferkarbonat beim Kochen mit blauer Farbe. Es gab keine Fällung mit Silbernitrat in stark ammoniakalischer Lösung und keine Tryptophanreaktion.

Die Flüssigkeit wurde auf ein kleines Volumen eingedampft und mit 95 proz. Alkohol gefällt (Alkoholniederschlag = I). Die eingeengte alkoholische Lösung gab mit Äther ebenfalls einen Niederschlag (= II).

Die alkohol-ätherische Lösung (= III) wurde durch Abdestillieren von Äther und Alkohol befreit und auf ein kleines Volumen eingedampft. Es krystallisierte ein scheinbar einheitlicher, neutral reagierender Körper in Nädelchen aus, der nicht in kaltem, leicht in siedendem Wasser löslich war, in Nädelchen sublimierte,

mit Quecksilberacetat, nicht aber mit Phosphorwolframsäure fällbar war und über 300° schmolz. Nach längerem Kochen mit Tierkohle und mehrmaligem Umkrystallisieren aus siedendem Wasser wurde er in schön weifsen grofsen Drusen (erinnernd an die „moosartigen Rasen“ Mieschers*) gewonnen. Die Ausbeute betrug über ein Gramm.

Analysen, sowie Eigenschaften des Körpers lassen es nicht zweifelhaft erscheinen, dafs hier Thymin vorlag.

0,1884 g Substanz lieferten 0,3291 g CO_2 und 0,0831 g H_2O
0,1558 g „ „ 31,38 ccm N bei t = 20,0° u. B = 762,0
0,1225 g „ verbrauchten 21,1 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure.

	C	H	N
Berechnet für $C_5H_6N_2O_2$	47,62 Proz.	4,76 Proz.	22,22 Proz.
Gefunden	47,64 „	4,93 „	23,52 „
			23,54 „

Wenn auch der Stickstoff zu hoch gefunden wurde, so konnte doch an der Auffassung der Substanz als Thymin um so weniger Zweifel bestehen, als sie nach geeigneter Vorbehandlung die von Steudel**) für das Thymin gefundene Weidelsche Reaktion gab. Durch Nitrierung einer kleinen Probe mit nachfolgender Reduktion bekam ich ein Produkt, das nach Behandlung mit Chlorwasser bei Ammoniakzutritt schöne Rotfärbung gab. Übrigens hat auch Kutscher***), der das Thymin zum ersten Male bei der Autolyse (Thymus) fand, einen zu hohen Stickstoffwert erhalten. Er vermutet eine Verunreinigung mit Uracil. Dafs in meinem Falle wohl eine solche vorgelegen hat, wird aus dem noch Mitzuteilenden wahrscheinlich. Die letzte Mutterlauge dieser Fraktion enthielt etwas Leucin.

Der Alkoholätherniederschlag (II) wurde in Wasser gelöst, wobei weifse Körner ungelöst zurückblieben. Dieselben gaben Millonsche Reaktion. Die Vermutung, dafs Tyrosin vorlag, bestätigte die Analyse. Durch mehrstündiges Kochen mit Tierkohle und mehrmaliges Umkrystallisieren erhielt ich die Substanz rein.

0,25 g Substanz verbrauchten 14,0 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure

Berechnet für $C_9H_{11}NO_3$	Gefunden
N = 7,73 Proz.	7,83 Proz.

Eine Portion des löslichen Teils des Alkoholätherniederschlages (II) wurde mit Kupferhydroxyd gekocht; das erhaltene schwer lösliche Kupfersalz erwies sich als Leucinkupfer.

*) Miescher-Schmiedeberg, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 37, 124.
**) H. Steudel, Zeitschr. f. physiol. Chem. 30, 539.
***) Fr. Kutscher, ebend. 34, 114.

Für 0,1005 g Kupfersalz wurden verbraucht 6,1 ccm $^1/_{10}$-Normalschwefelsäure.

Berechnet für $(C_6H_{12}NO_2)_2Cu$	Gefunden
N = 8,65 Proz.	8,50 Proz.

Nun wurden die noch restierenden Fraktionen (I, Rest von II und Mutterlauge von III) vereinigt und mit Sublimat in saurer Lösung gefällt. Dieser Niederschlag war gering und wurde nicht weiter verarbeitet.

Dagegen erhielt ich nach Zusatz von Natronlauge und weiterem Zusatz von Sublimat einen starken Niederschlag, der eine Verarbeitung lohnend erscheinen liefs.

Der Rest des Materials, der ebenfalls nicht weiter verarbeitet wurde, entwickelte beim Erwärmen mit Magnesia reichlich Ammoniak.

Die Behandlung des aus der alkalischen Lösung gefällten Quecksilberniederschlages gestaltete sich folgendermafsen. Da nach Entfernung des Quecksilbers durch Schwefelwasserstoff beim Eindampfen eine Krystallisation nicht erfolgte, so wurde nacheinander zuerst mit Pikrinsäure, dann mit Phosphorwolframsäure und dann das Filtrat nach Entfernung des letzteren Fällungsmittels wieder mit Sublimat und Natronlauge gefällt. Der reichliche Quecksilberniederschlag wurde durch Schwefelwasserstoff von Quecksilber befreit und eingedampft. Nun erst schieden sich Krystalle (Nadeln) aus, und zwar erhielt ich durch fraktionierte Krystallisation zwei scheinbar einheitliche Substanzen. Beide waren ziemlich leicht, mit neutraler Reaktion, in Wasser löslich, fielen aber bei 0° in Drusen aus, beide sublimierten, fielen mit Quecksilberacetat aus, gaben mit Phosphorwolframsäure keine Fällung. In trockenem Zustande unterschieden sie sich makroskopisch dadurch, dafs die erste beim Auskrystallisieren einen Krystallfilz, die zweite ein Pulver gab. Dieses Verhalten erinnerte an den schon von Ascoli*) bemerkten makroskopischen Unterschied zwischen Thymin und Uracil. Nur schien zunächst die leichte Löslichkeit meiner Substanzen gegen diese Vermutung zu sprechen, zudem lag der Schmelzpunkt der filzförmigen Substanz bei 248° (korr.), während das Thymin bei 321° schmilzt [E. Fischer]**). Die zweite, pulverförmige Substanz hatte keinen charakteristischen Schmelzpunkt (zwischen 300 und 315°). (Uracil schmilzt bei 335° [E. Fischer]***).

*) Alberto Ascoli, Zeitschr. f. phys. Chem. **31**, 161.

) E. Fischer und Roeder, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **34, 3751.

***) l. c.

Bei der Analyse des filzförmig krystallisierenden Körpers erhielt ich folgende Werte:

0,1150 g Substanz lieferten 0,1860 g CO_2 und 0,0505 g H_2O.

Berechnet für $C_5H_6N_2O_2$	für $C_4H_4N_2O_2$	Gefunden
C = 47,42 Proz.	42,87 Proz.	44,11 Proz.
H = 4,76 „	3,59 „	4,91 „

Die Zahlen liegen zwischen denen des Thymins und des Uracils. Die Annahme, dafs es sich hier um ein Gemenge beider handelt, liegt nahe und wird noch erhärtet sowohl durch den positiven Ausfall der Weidelschen Reaktion mit einem geringen Reste der Substanz, als durch die Analyse des pulverförmigen Körpers.

Derselbe wurde mit Tierkohle gekocht und noch mehrmals umkrystallisiert, wobei er in Wasser immer unlöslicher wurde. Die Analyse der möglichst gereinigten Substanz — dem weiteren Umkrystallisieren setzte die geringe Quantität eine Grenze — ergab:

0,1068 g Substanz gaben 0,1702 g CO_2 u. 0,0401 g H_2O
0,0637 g „ „ 13,78 ccm N bei t = 16,7° und B = 764,0

	C	H	N
Berechnet für $C_4H_4N_2O_2$	42,87 Proz.	3,59 Proz.	25,05 Proz.
Gefunden	43,45 „	4,20 „	25,59 „

Mit einem Teil der Mutterlauge gelang es mir, ebenfalls die Weidelsche Reaktion zu erhalten, so dafs ich nicht anstehe, den fraglichen Körper als Uracil anzusprechen. Seine Menge war viel (etwa achtmal) kleiner als die des Thymins.

Der Pikrinsäureniederschlag war amorph und konnte nicht zur Krystallisation gebracht werden, wohl aber das durch Behandeln mit konzentrierter Salzsäure und Äther daraus dargestellte salzsaure Salz. Indes konnte wegen der minimalen Menge kein Aufschlufs über die Natur der Substanz gewonnen werden.

Auch die Bearbeitung des Phosphorwolframats führte zu keinem gut charakterisierten Produkt. Ich kochte mit Baryt, entfernte das überschüssige Baryum mit Schwefelsäure und dampfte ein. Eine Krystallisation erfolgte nicht. Mit Platinchlorid erhielt ich einen amorphen Niederschlag, ebenso mit Pikrinsäure.

Bei der Autolyse der Lymphdrüsen finden sich somit als Spaltungsprodukte Ammoniak, Leucin, Tyrosin, Thymin und Uracil.

Es liegt nahe, meine Resultate mit den von Kutscher*) aus Thymus erhaltenen zu vergleichen. Er fand Ammoniak, Thymin und Lysin; es fiel ihm auf, dafs Tyrosin und Leucin fehlten. Bei mir war Tyrosin in relativ grofser Menge (ich schätze es auf min-

*) l. c.

destens 10 g) vorhanden; etwas geringer war die Ausbeute an Leucin. Dagegen konnte ich Lysin nicht gewinnen.

Es ist fraglich, welche Bedeutung diesen abweichenden Befunden beizulegen ist, zumal auf den Verlauf der Autolyse Momente von Einflufs sind, die wir noch nicht in wünschenswerter Weise beherrschen.

Neu ist der Befund von Uracil. Die von Kossel*) aufgeworfene Frage, ob das Uracil auch bei der Hydrolyse vorkommt, ist somit positiv zu beantworten.

Auffallend ist, dafs sich in der Ausgangsflüssigkeit nicht die Reaktion auf Purinbasen fand, was möglicherweise mit dem Auftreten von Thymin und Uracil in Zusammenhang steht. Doch es ist nach den in jüngster Zeit im hiesigen Laboratorium durch S. Fränkel**) gewonnenen Aufklärungen über den Bau des Histidins auch an eine Abstammung von diesem zu denken.

---

*) Kossel und Steudel, Zeitschr. f. phys. Chem. 37, 245.

**) S. Fränkel, An. d. K. Wiener Akademie 1903. Die ausführliche Mitteilung wird demnächst in den Monatsheften für Chemie erscheinen.

Kürzere Mitteilungen.

7. Über das Vorkommen von Glykuronsäure im ikterischen Harn.

Von Dr. **E. C. van Leersum.**

(Aus dem Laboratorium Pathologicum der Universität zu Amsterdam.)

Es ist eine allgemein bekannte Thatsache, dafs Gallenbestandteile enthaltende Urine im stande sind, Kupferoxyd in alkalischer Lösung zu reduzieren. Man ist geneigt, dieses Reduktionsvermögen, wenigstens zum Teil, auf Rechnung der Gallenfarbstoffe zu stellen.

Sahli (Lehrbuch der klinischen Untersuchungsmethoden, 1899, S. 509) nennt unter den Körpern, welche im Harne reduzierend wirken, neben Harnsäure, Kreatin und Kreatinin, unter anderen auch Gallenfarbstoff. Ebenso v. Jaksch (Klinische Diagnostik innerer Krankheiten, 1896, S. 374).

Ich habe nun gefunden, dafs bei der Reduktion im ikterischen Harn aufser den genannten Körpern noch eine andere Verbindung eine wichtige Rolle spielt, die in der letzten Zeit öfter besprochene Glykuronsäure.

Nachdem sich gezeigt hatte, dafs normale Ochsengalle Glykuronsäure enthält*), lag es nahe, anzunehmen, dafs unter den Bedingungen, bei denen Gallenbestandteile in Blut und Harn übergehen, Glykuronsäure regelmäfsig im Urin anwesend sein dürfte.

Diese Vermutung hat sich bei Untersuchung des Harns einiger mit Ikterus behafteter Patienten bestätigt.

Mir standen Urine von sechs Patienten zur Verfügung. Es waren Fälle von Stauungsikterus, Hanotscher Cirrhose, Pneumonia biliosa und Carcinoma ventriculi et hepatis. Die Urine enthielten sämtlich Gallenfarbstoff, jedoch keinen Zucker, zeigten keine Drehung der Polarisationsebene und reduzierten Fehlingsche Flüssigkeit nach längerem oder kürzerem Stehen, jedoch nicht in dem Mafse, dafs es zur Ausscheidung von gelbem Kupferoxydul gekommen wäre. (Die Lösung wurde nur trübe und färbte sich schmutzig-gelb.) Eine Ausnahme bildete nur der Urin des Patienten mit Cirrhose. Bei diesem gelang die Reduktion

*) Diese Beiträge 3, Heft 11.



erst nach vorherigem Kochen mit Schwefelsäure. Ohne Ausnahme reduzierten sämtliche Urine deutlich und innerhalb kurzer Zeit, wenn sie vorher mit Schwefelsäure einige Minuten lang gekocht worden waren. Die Orcinreaktion gelang im ursprünglichen Harn nicht immer. Sie trat meistens erst auf, wenn durch Kochen mit Säure im Reagenzröhrchen oder beim Erhitzen in einer starken, gut verschlossenen Flasche bis zu 102° C. die gepaarten Glykuronsäuren gespalten waren. Zusatz von ein paar Tropfen Eisenchlorid (Bial) erwies sich öfters als vorteilhaft.

Ich konnte ferner mittels des Schwefelsäure-Alkoholäther-Gemisches Glykuronsäure aus den ikterischen Harnen extrahieren, was durch positiven Ausfall der Orcinreaktion sicher gestellt wurde; jedoch waren hierbei die ins Extrakt übergetretenen Farbstoffe sehr hinderlich.

Mit der Darstellung der p-Bromhydrazinglykuronsäure, eigentlich dem exaktesten Mittel zum Nachweis der Säure, hatte ich weniger Glück. Nur in einem Fall gelang es mir, mit 50 ccm vorher mit Schwefelsäure gekochten Harns die charakteristischen Krystalle zu gewinnen. Sonst war mir dies nicht möglich. Es bildete sich stets nach dem Abkühlen ein dicker, schwarzer Niederschlag, worin ich die Krystalle nicht auffinden konnte.

Es ist gerade die große Menge Farbstoff, welche im ikterischen Urin den Nachweis der Glykuronsäure sehr schwierig macht. Der Harn, der bei Ikterus schon dunkel genug gefärbt ist, nimmt nach dem Kochen mit Schwefelsäure und in stärkerem Maße noch bei der eigentlichen Orcinreaktion, sei es mit oder ohne Zusatz von Eisenchlorid, eine äußerst dunkle Farbe an, welche Ursache ist, daß man in dem dunkelrot gefärbten Amylalkoholextrakt spektroskopisch nur mit Mühe etwas von den bekannten Absorptionsstreifen sehen kann. Öfters ist das ganze Spektrum, mit Ausnahme eines Teiles vom Rot, ganz verdunkelt, und man ist sodann genötigt, den Amylalkoholauszug passend zu verdünnen, wobei es oft erst nach mehreren Versuchen gelingt, den Streifen zu erkennen. Ich habe bemerkt, daß die Streifen etwas deutlicher werden, wenn die Flüssigkeit einige Zeit gestanden hat und öfters geschüttelt wird. Es scheint, als ob der Stoff, um welchen es sich hier handelt, weniger leicht als die anderen Pigmente in den Amylalkohol überträte. Ich möchte also davor warnen, nach einer ersten mißlungenen Probe die Untersuchung sofort aufzugeben.

Man kann freilich den Urin behufs Entfernung der Gallenfarbstoffe mit Kalkmilch oder Tierkohle behandeln. In einem auf solche Weise behandelten Harn fiel die Orcinreaktion positiv aus. Es ist aber möglich, daß bei dieser Methode ein Teil der Glykuronsäure verloren geht *).

*) Das beste Mittel zur Prüfung des Reduktionsvermögens zuckerfreier Harne bleibt noch immer die Fehlingsche Flüssigkeit. Ich setze bei der Probe, auch bei Zuckerharnen, zu 1 oder 2 ccm Harn 5 bis 10 ccm Fehlingscher Flüssigkeit. Bei Zuckerharnen bietet dies den Vorteil, daß die reduzierenden Stoffe außer Zucker so stark verdünnt werden, daß sie auf die Reduktion keinen Einfluß ausüben können.

Die angebliche reduzierende Eigenschaft der Gallenfarbstoffe kann meines Erachtens nicht aufrecht erhalten werden. Reines Bilirubin reduziert ganz bestimmt das Kupferoxyd in alkalischer Lösung nicht, wie sich bei Versuchen mit 5 mg Bilirubin in 40 ccm Fehlingscher Flüssigkeit, zwei Minuten langem Kochen und zwei- bis dreistündigem ruhigen Stehen ergeben hat. Ich glaube vielmehr mit Bestimmtheit annehmen zu können, dafs die Ursache der Reduktion seitens ikterischer Harne in der Anwesenheit gepaarter Glykuronsäure gelegen ist.

Ich komme immer mehr zu der Überzeugung, dafs die Glykuronsäure zu den normalen Stoffwechselprodukten gehört, zumal es mir auch gelungen ist, diese Verbindung, aufser in der Rindergalle auch in menschlichen und tierischen Gallensteinen und im Pferdeblutserum aufzufinden. Der Salzsäureauszug der vorher mit Äther ausgezogenen menschlichen Gallensteine enthält so viel Glykuronsäure, dafs man damit sehr schöne Orcinreaktion erhalten kann. Inwieweit gewisse Krankheiten, Fieber, Dyspnoe, wie P. Mayer*) annimmt, im stande sind, zur Vermehrung der Glykuronsäurebildung Anlafs zu geben, wage ich nicht zu beurteilen. Jedenfalls erscheint es mit Rücksicht auf die von mir besprochenen Thatsachen notwendig, eine solche Vermehrung auf quantitativem Wege zu beweisen.

---

8. Über die Autolyse der leukämischen Milz.

Von O. Schumm.

(Aus dem chemischen Laboratorium des Allgemeinen Krankenhauses Hamburg-Eppendorf.)

In der leukämischen Milz sind reichliche Mengen von „Pepton" gefunden worden[1]). von Jaksch[2]) fand es auch in der normalen Milz. — In der frischen Milz vom Rind, Pferd, Schwein, Schaf und Hund wiesen neuerdings Hedin und Rowland[3]) ein proteolytisches Enzym nach, das am stärksten in saurer Lösung wirkt. Bisher ist meines Wissens noch nicht untersucht worden, ob bei der Autolyse der leukämischen Milz ihr Gehalt an „Pepton" eine Änderung erleidet. Ein Fall von akuter Leukämie bei einem 25 jährigen Manne bot mir die Gelegenheit, einen derartigen Versuch auszuführen. Der Kranke starb am 17. Tage nach seiner Aufnahme in das Krankenhaus. Die sehr stark vergröfserte Milz wurde mir von der chirurgischen Abteilung freundlichst zur Verfügung gestellt. Die Sektion fand 20 Stunden nach dem Tode statt; bis dahin war die Leiche im Kühlraum aufbewahrt gewesen. Gleich nach der Sektion wurde die Milz sorgfältig zerkleinert und zerquetscht; von dem erhaltenen schwach sauer reagierenden, gleichmäfsigen Organbrei wurden:

*) Deutsch. med. Wochenschr. 1901, Nr. 16. u. 17.

I. 700 g mit der doppelten Menge Wasser unter Zusatz von Chloroform (nach Salkowski) in einem gut verschlossenen Glasgefäſs unter zeitweiligem Umschütteln sechs Wochen bei 37° stehen gelassen;

II. 150 g mit der doppelten Menge Wasser aufgekocht; das verdampfte Wasser wurde ersetzt und das Gemisch nach Zusatz von Chloroform in einem gut verschlossenen Glasgefäſs unter zeitweiligem Umschütteln ebenfalls sechs Wochen bei 37° stehen gelassen.

Während bei der Portion I die über dem Niederschlage stehende Flüssigkeit bald einen tief bräunlichgelben Farbenton annahm und klar wurde, blieb bei der Portion II die über dem Bodensatze stehende Flüssigkeit unverändert hellgelb und stark trüb. Am Schluſs der Digestionszeit enthielten beide Portionen noch genügend Chloroform; bei beiden war die Reaktion sauer. Sie wurden im bedeckten Trichter durch ein Filter aus dichtem Papier filtriert; das Filtrat der Portion II blieb stark getrübt.

Das Filtrat von I gab schwache, das von II sehr starke Biuretreaktion. In beiden Filtraten wurde der Stickstoff nach Kjeldahl bestimmt. Ferner wurden gleiche Mengen von beiden Filtraten zu möglichster Entfernung etwa noch vorhandener koagulabler Eiweiſsstoffe aufgekocht, unter Anwendung kleiner Filter aus hartem Filtrierpapier filtriert, die Filter mit möglichst wenig heiſsem Wasser nachgewaschen, die Filtrate auf ein bestimmtes Volumen aufgefüllt und ihr Stickstoffgehalt bestimmt.

Der ermittelte Stickstoffgehalt betrug:

bei Filtrat I.	a) vor dem Enteiweiſsen	0,749 Proz.
	b) nach dem Enteiweiſsen	0,735 „
bei Filtrat II.	a) vor dem Enteiweiſsen	0,297 „
	b) nach dem Enteiweiſsen	0,243 „ *)

Der Rest der beiden enteiweiſsten Flüssigkeitsmengen wurde nach den bekannten Methoden von Kühne, Neumeister, Pick auf Albumosen und Pepton (Kühne) geprüft und zwar mit folgendem Ergebnis:

*) In ähnlicher Weise habe ich die Milz von einem Falle von Perityphlitis mit nachfolgender Peritonitis untersucht. Das Organ wurde gleich nach der Entnahme sorgfältig zerkleinert; von dem sauer reagierenden gleichmäſsigen Organbrei wurden

I. 42,5 g mit der doppelten Menge Wasser unter Zusatz von Chloroform 8 Tage lang bei 37° stehen gelassen;

II. 42,5 g mit der doppelten Menge Wasser aufgekocht und nach Ersatz des verdampften Wassers und Zugabe von Chloroform ebenso behandelt.

Die Analyse ergab folgenden Stickstoffgehalt:

Filtrat I.	a) vor dem Enteiweiſsen	0,714 Proz.
	b) nach dem Enteiweiſsen	0,672 „
Filtrat II.	a) vor dem Enteiweiſsen	0,224 „
	b) nach dem Enteiweiſsen	0,217 „

	I.	II.
Primäre Albumosen	Spuren	reichliche Menge
Sekundäre Albumosen	geringe Menge	reichliche Menge
Pepton (Kühne)	Spuren	geringe Menge

Bei der weiteren Untersuchung des Filtrats II liefs sich eine geringe Menge durch Magnesia austreibbaren Stickstoffs nachweisen; Leucin und Tyrosin konnte ich nicht auffinden. Ebenso liefsen sich auch die Eiweifsbasen nicht nachweisen; es wurden zwar in der Histidin-, Arginin- und Lysinfraktion Niederschläge erhalten, sie waren aber so gering, dafs die weitere Verarbeitung aussichtslos war.

Von dem Filtrat I wurde ein kleinerer Teil für andere Versuche zurückgestellt, der gröfsere Teil, entsprechend 400 g Milz, wurde nach den Methoden Kossels[4]) auf die hydrolytischen Spaltungsprodukte der Eiweifskörper untersucht. Der Gang der Untersuchung war derselbe, wie ihn Kutscher[5]) bei seiner Untersuchung über das proteolytische Enzym der Thymus benutzte. Beim Ausfällen der Flüssigkeit mit Barytwasser entwickelte sich reichlich Ammoniak. Von den Eiweifsbasen konnte ich das Lysin mit Sicherheit nachweisen. Die Ausbeute an Lysinpikrat betrug etwas über 2 g; die Bestimmung des Gehalts an Kohlenstoff und Wasserstoff ergab auf das Lysinpikrat passende Zahlen. In der Argininfraktion erhielt ich eine geringe Fällung, aus der sich nur eine winzige Menge eines nicht krystallisierenden Sirups gewinnen liefs. Aus der Histidinfraktion konnte ich auch nur eine kleine Menge eines Sirups erhalten, der nicht zur Krystallisation zu bringen war.

Von Monoamidosäuren konnte ich Asparaginsäure und Glutaminsäure nicht auffinden, dagegen gelang es mir, 0,1 g Tyrosin und etwa die doppelte Menge Leucin abzuscheiden. Das Tyrosin wurde aufser durch seine Krystallform durch die Millonsche, Piriasche und Mörnersche[6]) Reaktion, das Leucin durch die Art der Sublimation und die Scherersche Probe identifiziert.

Thymin habe ich unter den Spaltungsprodukten nicht aufgefunden.

Die Untersuchung hat somit folgendes ergeben:

1. Der reichliche Gehalt der leukämischen Milz an Albumosen geht bei der Autolyse bis auf eine geringe Menge zurück.
2. Es treten andere charakteristische Produkte der hydrolytischen Eiweifsspaltung auf, von denen Lysin. Leucin, Tyrosin und Ammoniak nachgewiesen wurden.
3. Trotz der bedeutenden Verminderung des Gehalts an Albumosen haben die nicht koagulierbaren Stickstoffsubstanzen eine Vermehrung bis zum Dreifachen der ursprünglich vorhandenen Menge erfahren; sie müssen daher zum gröfseren Teile aus dem koagulablen Teil der Milzsubstanz durch Autolyse entstanden sein.
4. Die bei der achttägigen Autolyse der Milz von einem Falle von Perityphlitis mit nachfolgender Peritonitis gebildete Menge nicht

koagulierbarer Stickstoffsubstanzen war annähernd so grofs wie bei der leukämischen Milz.

Die Autolyse der leukämischen Milz nimmt anscheinend einen ähnlichen Verlauf wie die von Kutscher[7]) studierte Autolyse der Thymus. Kutscher konnte in seinem Versuche bei der Verarbeitung von etwa 500 g Kalbsthymus unter den hydrolytischen Spaltungsprodukten der Eiweifsstoffe mit Sicherheit nur Lysin und Ammoniak nachweisen, und zwar beide in gröfserer Menge. Das sind aber dieselben Spaltungsprodukte, die auch bei der Autolyse der leukämischen Milz im vorliegenden Versuche in relativ reichlicher Menge nachgewiesen wurden.

Gegenstand meiner weiteren Versuche ist es, zu ermitteln, ob sich bei Verarbeitung einer gröfseren Menge Material noch andere hydrolytische Spaltungsprodukte in der autolysierten leukämischen Milz auffinden lassen, ob die Autolyse der normalen menschlichen Milz dieselben Spaltungsprodukte liefert; ferner, welchen Einflufs die Dauer der Autolyse auf das Auftreten der einzelnen Spaltungsprodukte hat.

Litteratur.

[1]) Salkowski, Virchows Archiv **81**, 166 (1881). — E. Ludwig, Wiener med. Wochenschr. 31, 122 (1881). — von Jaksch, Zeitschr. f. physiol. Chem. **16**, 243.

[2]) loc. cit.

[3]) Hedin und Rowland, Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 341. — Dieselben, daselbst **32**, 531.

[4]) Kossel und Kutscher, daselbst **31**, 165.

[5]) Kutscher, daselbst **34**, 114.

[6]) Mörner, daselbst **37**, 86.

[7]) loc. cit.

Berichtigungen.

Seite 267 Zeile 1 von unten lies: Nr. 8 statt Nr. 8, 1,99.
„ 269 „ 3 „ „ „ gemeinem statt geronnenem.
„ 271 „ 13 „ „ „ 1,40 statt 0,40.

Beiträge
zur
Chemischen Physiologie
und
Pathologie

Zeitschrift für die gesamte Biochemie

unter

Mitwirkung von Fachgenossen herausgegeben

von

Franz Hofmeister

o. Professor der physiologischen Chemie an der Universität Strassburg

---

III. Band 12. Heft

(Ausgegeben April 1903)

Braunschweig

Druck und Verlag von Friedrich Vieweg und Sohn

1903

Inhalt des 12. Heftes.

Die „Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie" erscheinen in zwanglosen Heften, von denen 12 einen Band von 36 Druckbogen zum Preise von M. 15,— bilden.

Die Ausgabe der Hefte erfolgt nach Maßgabe des einlaufenden Materials in kurzen Zwischenräumen. Die Zahl der in einem Jahre erscheinenden Bände soll zwei nicht überschreiten.

Manuskriptsendungen sind an den Herausgeber, Straßburg i. E., Wimpfelingstraße 2, zu richten.

Bei der Aufnahme von Arbeiten in die „Beiträge" soll in erster Reihe deren biologisches Interesse, sodann Exaktheit der Durchführung, Sachlichkeit, Knappheit und Übersichtlichkeit der Darstellung maßgebend sein. Polemische Ausführungen, welche den Rahmen einer thatsächlichen Richtigstellung überschreiten, können nicht Aufnahme finden. Der kurzen Mitteilung neuer Befunde bleibt ein besonderer Raum vorbehalten. Solchen „kürzeren Mitteilungen" kann ein besonders rasches Erscheinen zugesichert werden.

Die Mitarbeiter erhalten ein Honorar von M. 40,— für den Druckbogen und 50 Sonder-Abzüge.


UNIVERSITY OF MICHIGAN
3 9015 07671 3182



